

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1922-23.

N° 2.

CULTURE DU BACILLE PYOCYANIQUE

SUR MILIEUX CHIMIQUEMENT DÉFINIS

THÈSE

Pour l'obtention du Diplôme supérieur de Pharmacien

Présentée et soutenue le 1923

PAR

ANDRÉ LIOT

DOCTEUR EN PHARMACIE,
PRÉPARATEUR A L'ACADÉMIE DE MÉDECINE,
LAURÉAT DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE,
PRIX BOGGIO ET CLARENS (1922)

JURY { MM. RADAIS, Président;
PERROT, Professeur;
GORIS, Agrégé.

PARIS

IMPRIMERIE DE LA COUR D'APPEL

L. MARETHEUX, Directeur

1, RUE CASSETTE, 1

1923

CULTURE

DU BACILLE PYOCYANIQUE

SUR MILIEUX CHIMIQUEMENT DÉFINIS

PAR

ANDRÉ LIOT

PHARMACIEN SUPÉRIEUR

DOCTEUR EN PHARMACIE

PRÉPARATEUR A L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

LAURÉAT DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

PRIX BOGGIO ET CLARENS (1922)

Les sciences gagnent toutes à se
faire des emprunts mutuels, et chaque
nouveau point de contact est marqué
pour elles par de nouveaux progrès....

PASTEUR,

PARIS

IMPRIMERIE DE LA COUR D'APPEL

L. MARETHEUX, Directeur

—
1923



A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ A. GORIS

PHARMACIEN DES HÔPITAUX DE PARIS
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

Témoignage d'affectueuse reconnaissance.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A LA MÉMOIRE DE MA SŒUR

A LA MÉMOIRE DE MON FRÈRE

MÉDAILLE MILITAIRE, CROIX DE GUERRE

MORT POUR LA FRANCE

A MA MÈRE

Témoignage de vive affection.

A MES AMIS

CULTURE DU BACILLE PYOCYANIQUE

SUR MILIEUX CHIMIQUEMENT DÉFINIS

INTRODUCTION

Le bacille pyocyanique type a la propriété de développer dans les milieux de culture une substance particulière connue sous le nom de *pyocyanine* qui se comporte comme un véritable alcaloïde; isolée par Fordos (1) elle fut l'objet d'une étude très complète de Gessard.

Déplacée de ses combinaisons salines par les alcalis, elle est entraînable par le chloroforme qu'elle colore en bleu ciel foncé. Ce dernier, agité avec de l'eau additionnée d'un acide, l'acide sulfurique ou l'acide chlorhydrique par exemple, perd sa coloration bleue, tandis que la pyocyanine passe dans l'eau acidulée à l'état de combinaison de sulfate ou de chlorhydrate de pyocyanine en donnant une solution rouge.

Le bacille pyocyanique produit cette substance chromogène avec les bouillons nutritifs ordinaires et principalement en présence de peptone. Il la produit également, ainsi que l'a montré Gessard, sur des milieux chimiquement définis constitués par une solution renfermant à la fois du succinate d'ammoniaque, du sulfate de magnésie et du phosphate de potasse (2).

(1) M. FORDOS, Recherches sur la matière colorante des suppurations bleues : pyocyanine. *C. R. Acad. Sc.*, **51**, p. 215, 1860.

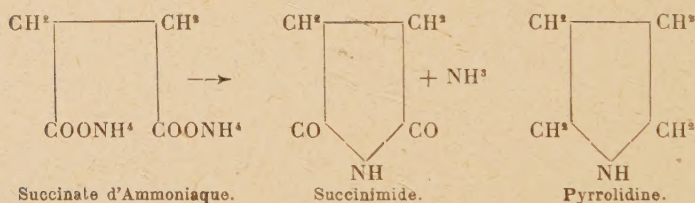
(2) On connaît également un bacille étudié par M. Radais (*) et qui, cultivé sur milieux favorables à l'apparition de pigments, donne tout d'abord les teintes habituelles du bacille pyocyanique, puis une teinte foncée passant au noir, coloration due à l'action de la tyrosinase, sécrétée par le bacille, sur la tyrosine des milieux, comme l'a montré Gessard.

(*) RADAIS, Sur une nouvelle race du bacille pyocyanique. *C. R. Soc. de Biol.*, t. IV, 10^e série, 1897, p. 808.

Enfin, comme nous l'établirons, le microbe, toujours accompagné de son pigment, est capable de se développer sur des milieux encore plus simples, telle qu'une solution aqueuse de succinate d'ammoniaque.

La constatation de ce dernier fait a été le point de départ de toutes ces recherches. Ayant réussi à cultiver le bacille pyocyannique sur un milieu particulièrement simple, nous espérons parvenir à expliquer la formation de ce pigment alcaloïdique par le microbe au moyen d'une suite de transformations chimiques dont il serait possible de saisir les différentes étapes s'effectuant à partir du succinate d'ammoniaque.

Le succinate d'ammoniaque peut donner aisément naissance par cyclisation de sa chaîne à de la succinimide qui, par réduction, conduit à des bases pyrrolidiques.



Notre première idée fut donc de rechercher si les réactions précédentes ne permettraient pas d'expliquer le mécanisme de la production de la pyocyanine dans les cultures.

Nous étions d'autant plus fondés à admettre cette hypothèse que, lorsqu'on cultive le bacille pyocyannique en présence de succinate d'ammoniaque, il y a dégagement d'ammoniaque, de même qu'il y a perte d'ammoniaque lorsqu'on passe du succinate d'ammoniaque à la succinimide.

Les recherches, dès le début, ont été conduites dans deux directions ; d'une part, nous avons préparé une quantité aussi importante que possible de pyocyanine, dans le but de poursuivre l'étude de sa constitution chimique et nous avons ainsi constaté que cette substance n'est pas un corps à noyau pyrrolidique. Ce résultat nous oblige à admettre que, si conformément à notre hypothèse, les réactions précédentes concourent à la formation de pyocyanine, les bases pyrrolidiques ne constituent pas le terme final de transformation subie par le succinate d'ammoniaque.

D'autre part, nous avons étudié la valeur nutritive des différents sels ammoniacaux. Dans une première série d'essais nous avons mis en expérience les sels dérivés des acides organiques bibasiques, homologues de l'acide succinique, puis nous avons envisagé d'autres groupes de sels ammoniacaux.

Nous avons pu ainsi remarquer que beaucoup de sels organiques de formules moins complexes que les sels des acides bibasiques pouvaient être offerts comme aliments au bacille pyocyanique. Et cette constatation nous conduit encore à délaisser la première hypothèse d'après laquelle les sels ammoniacaux des acides bibasiques possédant deux fonctions acides en position γ devaient seuls convenir pour la culture du microbe et la production du pigment.

Ces recherches nous ont donc entraîné loin de l'idée première, mais elles ont présenté un double intérêt : 1° celui d'apporter des exemples de milieux très simples et bien définis pouvant servir d'aliments aux microbes ; 2° de bien mettre en évidence les rapports étroits qui existent entre la constitution chimique d'une substance et sa valeur nutritive.

Ce travail se termine par l'étude de la nutrition du microbe sur des milieux renfermant à la fois des substances sucrées et des sels ammoniacaux dérivant d'acides minéraux ; mais, contrairement à ce que l'on pouvait supposer, ces milieux ont une constitution beaucoup plus complexe que les précédents. Le microbe, au cours de sa vie, transforme le sucre en un certain nombre de produits plus simples, et le milieu primitivement bien défini se trouve être remplacé par un milieu dont les éléments constitutants ne sont pas exactement connus.

La complication est certainement encore plus grande pour les milieux renfermant des matières albuminoïdes, aussi simples fussent-elles. Aussi les résultats apportés par ces dernières expériences sur les sucres et les matières albuminoïdes sont-ils pratiquement assez difficiles à interpréter lorsqu'on les considère séparément. Mais lorsqu'on rapproche les faits observés de tous ceux que nous avons accumulés au cours de nombreuses expériences, on peut en tirer cette conclusion que les sels ammoniacaux à acides organiques sont la substance nécessaire à la production de pyocyanine.

Le plan suivi dans ce travail a été le suivant :

- 1^{re} PARTIE. } *Chapitre I* : Conditions de culture.
 } *Chapitre II* : Production et extraction de la Pyocyanine.
- 2^e PARTIE. } *Chapitre I* : Cultures en présence des sels ammoniacaux
 } d'acides organiques monobasiques.
 } *Chapitre II* : Cultures en présence des sels ammoniacaux
 } d'acides organiques bibasiques.
 } *Chapitre III* : Cultures en présence des sels ammoniacaux
 } d'acides organiques possédant une ou plu-
 } sieurs fonctions oxygénées (alcool, phénol,
 } cétone).
- 3^e PARTIE. } *Chapitre I* : Cultures en présence d'amines.
 } *Chapitre II* : Cultures en présence d'amides.
 } *Chapitre III* : Cultures en présence d'acides aminés.
- 4^e PARTIE. } *Chapitre I* : Cultures en présence de sels ammoniacaux
 } minéraux.
 } *Chapitre II* : Cultures en présence d'alcools polyatomiques
 } ou de sucres.
 } *Chapitre III* : Cultures en présence de sels ammoniacaux
 } minéraux et de substances hydrocarbonées.
- 5^e PARTIE. : *Chapitre I* : Exposé critique des résultats obtenus.
- CONCLUSIONS.

MM. les professeurs Moureu, Delépine, Sommelet, Morel, ainsi que MM. Landrieu, Delaby, en mettant à notre disposition plusieurs produits obtenus à l'état de pureté, et que nous n'avons pas dû préparer, ont grandement facilité nos travaux; nous les prions d'agréer nos sincères remerciements.

Nous remercions également M. le D^r Guggenheim des substances qu'il nous a procurées.

Avant d'aborder notre sujet, qu'il nous soit permis d'exprimer à M. le professeur Radais, doyen de la Faculté, qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse, l'hommage de nos sentiments respectueux.

C'est pour nous un agréable devoir d'adresser l'expression de notre gratitude à M. le professeur Em. Perrot, auprès duquel nous avons toujours trouvé le plus bienveillant accueil.

Notre Maître, M. le professeur agrégé Goris, pharmacien des hôpitaux, a bien voulu nous inspirer le sujet de cette thèse : c'est à lui que nous dédions ce travail en témoignage de sincère attachement et d'affectueuse reconnaissance.

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE I

CONDITIONS DE CULTURE — ORIGINE DU MICROBE MILIEUX CULTURAUX

Les premiers essais furent faits avec le succinate d'ammoniaque comme source d'aliment. Il est donc rationnel de préciser dès le début la technique suivie pour l'utilisation de ce sel, car toutes les expériences postérieures seront méthodiquement calquées sur cette technique. Nous envisagerons tout d'abord la race microbienne mise en expérience, ensuite nous considérerons les milieux.

RACE MICROBIENNE. — Le microbe qui a servi pour toutes ces recherches provient d'une souche de l'Institut Pasteur, désignée sous la rubrique, race A, variété pyocyanogène. Toutes les générations successives sont donc des cultures filles de celle-ci.

MILIEU NUTRITIF. — Le milieu nutritif utilisé dans ces essais est un milieu minéral simplifié.

Les premières cultures furent faites sur un milieu indiqué autrefois par Gessard et dont la composition est la suivante :

Sulfate de magnésie	2 gr. 50
Phosphate de soude ou de potasse.	5 gr.
Chlorure de calcium	1 gr. 25
Succinate d'ammoniaque.	5 gr.
Eau distillée	1.000 gr.

Dans la suite nous avons été amenés à supprimer le chlorure de calcium, à remplacer le phosphate de potasse par le phosphate de soude, à réduire la proportion de succinate d'ammoniaque, sans que pour cela la production de pyocyanine ait été amoindrie. L'élimination des sels diminue ainsi le nombre des facteurs dont on aura à tenir compte dans l'interprétation des résultats.

Finalement nous nous sommes arrêtés à la formule suivante dont la teneur en sels est très favorable pour obtenir une production suffisante de pyocyanine :

Phosphate de soude ($\text{PO}_4 \text{HNa}^3 + 12 \text{H}^2\text{O}$)	5 gr.
Sulfate de magnésie ($\text{So}^4 \text{Mg}^2 + 7 \text{H}^2\text{O}$)	2 gr. 5
Succinate d'ammoniaque	2 gr. 5
Eau bi-distillée	1.000 gr.

Le microbe ensemencé sur ce milieu se développe convenablement et la coloration vert bleu apparaît après 36-48 heures, elle passe ensuite peu à peu à la teinte feuille morte.

Pour expérimenter nous avons préparé un milieu liquide et un milieu solide et donné la préférence à ce dernier qui offre l'avantage d'être plus maniable, de permettre de pouvoir mieux suivre le développement du microbe, de favoriser la production de pyocyanine qui se manifeste plus rapidement; dans ces conditions, elle apparaît soit après vingt-quatre heures, soit après trente-six heures, tandis qu'elle est plus tardive sur milieu liquide.

Préparation du milieu solide (Gélose minéralisée).

Nous avons préparé séparément les deux solutions suivantes :

1° Phosphate de soude	5 gr.	2° Sulfate de magnésie	2 gr. 5
Eau bi-distillée	125 c. c.	Eau bi-distillée	125 c. c.

Ces solutions ont été ensuite stérilisées à $+ 115^\circ$ pendant vingt minutes.

D'autre part la solution de gélose a été obtenue par le procédé suivant :

25 grammes de gélose commerciale, coupée en petits morceaux, ont été mis à macérer dans 750 cent. cubes d'eau bi-distillée; on laisse macérer en vase clos pendant quarante-huit heures en remuant à plusieurs reprises,

puis on fait dissoudre à l'autoclave en vapeur fluente (vers $+ 100^{\circ}$) et l'on filtre à chaud sur papier filtre Chardin. Avant refroidissement, c'est-à-dire vers $+ 40^{\circ}$, on ajoute au liquide limpide la solution de phosphate de soude, puis celle de sulfate de magnésie en ayant soin de bien agiter après chaque addition. On filtre à nouveau, mais cette nouvelle opération n'est pas indispensable, car nous avons pu constater, par des résultats comparatifs, que les conditions de culture n'étaient nullement modifiées dans l'un ou l'autre cas. On répartit ensuite par 10 cent. cubes en tubes préalablement stérilisés, en observant les précautions habituelles. On évite ainsi l'action prolongée de la chaleur qui favorise la formation d'un précipité dû à l'action des sels minéraux ajoutés sur les sels de calcium contenus dans la gélose.

C'est à cette *gélose minéralisée* que nous ajoutons, lors du besoin, les doses nécessaires de succinate d'ammoniaque dissous dans de l'eau bi-distillée, stérile.

Au moment de l'emploi on fait fondre au bain-marie la quantité de tubes de gélose nécessaire et on ajoute à chaque tube X gouttes de la solution de succinate d'ammoniaque à 1/10.

On agite et on laisse solidifier en inclinant les tubes.

La technique qui vient d'être exposée donne toujours des milieux de consistance suffisante et adhérant bien aux tubes à essai.

Le succinate d'ammoniaque est représenté par la formule $\text{CO}^2\text{NH}^4 - (\text{CH}_2)_4 - \text{CO}^2\text{NH}^4 = 152$, 152 grammes de ce sel contiennent 34 d'ammoniaque. Les X gouttes utilisées, renfermant 0 gr. 05 de sel, correspondent à 0 gr. 011 d'ammoniaque. C'est sur ce milieu que nous avons entretenu la souche pendant toute la durée des essais, et c'est toujours lui qui a servi pour obtenir les tubes témoins dans chaque série d'expériences.

Poussant même plus loin la simplification du milieu minéral nous sommes allés jusqu'à supprimer totalement les sels, et nous avons été ainsi amenés à faire comparativement des essais en utilisant uniquement le succinate d'ammoniaque comme substance alimentaire.

Comme précédemment le microbe a été cultivé sur milieu liquide et sur milieu solide dont la préparation est des plus simples.

Le *milieu liquide* est obtenu en ajoutant X gouttes de la solution de succinate d'ammoniaque à 1/10 à 5 cent. cubes d'eau bi-distillée, stérilisée..

Le *milieu solide* est uniquement constitué par une solution aqueuse de gélose à 20 p. 1.000 préparée et filtrée dans les mêmes conditions que la solution de gélose ci-dessus décrite pour la préparation de la gélose minéralisée; on y ajoute après

répartition en tubes X gouttes de la solution de succinate d'ammoniaque à 1/10. Nous la désignons sous le nom de *gélose non minéralisée*.

Dans ce dernier cas, seules les substances minérales de la gélose peuvent intervenir, et, voulant connaître la proportion de sels minéraux qu'elle renferme, nous avons étudié la composition minérale de la gélose qui a toujours servi à ces expériences.

Composition des cendres de la gélose (1).

Lorsqu'en 1859 Payen (2) étudia la gélose, il lui attribua la composition globale suivante : carbone, 42,770 ; hydrogène, 5,775 ; oxygène, 51,455 (moyenne de deux analyses) ; mais il ne fit pas connaître sa teneur en cendres. Les nombreuses analyses qui furent publiées dans la suite, se rapportant surtout à la constitution des matières organiques contenues dans cette substance, mentionnent la proportion des cendres dont la teneur est de 3,4 p. 100 d'après Kellner (3) ; 4,13 p. 100 selon Davidsohn (4) ; 3,5 p. 100 d'après König et Bettels (5) ; Morin (6) et Porumbaru (7), qui les premiers en France ont fait connaître la proportion des cendres fournies par la gélose, ont trouvé 3,88 p. 100 et 3,50 p. 100. Ces chiffres sont comparables et la proportion ne s'est pour ainsi dire pas modifiée puisque l'échantillon que nous avons analysé a donné une quantité de 2,8 p. 100. Les chiffres récemment publiés par Neucomb et Smythe (8) sont un peu supérieurs, leurs résultats

(1) Pour l'étude générale de la gélose, voir EM. PERROT et C.-L. GATIN, Les Algues marines et en particulier les Algues alimentaires d'Extrême-Orient. *Ann. Institut océanographique*, Paris, 1911, 3, fasc. 1.

(2) PAYEN. *Précis de Chimie industrielle*, 6^e édit., 2, p. 33, 1878 ; et Sur la gélose et les nids de salangane. *C. R. Acad. Sc.*, 49, 1859, p. 521.

(3) KELLNER, *Jap. chem. anal. of a collection of agric. specimen Intern. agr. exhib.*, New Orléans 1884 ; in A. TSCHIRCH, *Handbuch d. Pharmakognosie*, 23, p. 311.

(4) DAVIDSOHN in A. TSCHIRCH, *loc. cit.*, 23, p. 312.

(5) J. KÖNIG und J. BETTELS, Die Kohlenhydrate der Meeresalgen und daraus hergestellte Erzeugnisse. *Zeitschr. Unters. d. Nahr. und Genussmit.*, 10, 1905, p. 460.

(6) MORIN, Sur la gélose. *C. R. Acad. Sc.*, 1880, 90, p. 924.

(7) PORUMBARU, Sur la gélose. *C. R. Acad. Sc.*, 1880, 90, p. 1081.

(8) E. L. NEUCOMB et C. E. SMYTHE, Notes on the moisture and ash content of Agar. In *Journ. Am. Ph. Ass.*, 1921, 10, p. 524.

ayant été les suivants : 3,98, 3,89, 4,11, 4,35, 4,50 et 4,33 p. 100 de cendres.

Nous avons cherché à établir aussi exactement que possible la constitution de ces cendres ; nous avons dans ce but suivi les méthodes habituelles employées pour l'analyse des cendres de végétaux, comportant une analyse qualitative et une analyse quantitative.

ANALYSE QUALITATIVE. — Pour cette analyse, deux parts du produit à analyser ont été faites : l'une a été chauffée à basse température pour obtenir une masse charbonneuse et afin d'éviter toute perte de chlorures par volatilisation, l'autre a été l'objet d'une calcination prolongée jusqu'à formation de cendres blanchâtres pulvérulentes.

La partie charbonneuse friable a été épuisée après refroidissement avec de l'eau légèrement tiédie acidulée par de l'acide azotique ; on a obtenu sur ce liquide filtré une réaction légèrement positive des chlorures.

Les cendres blanches ont été traitées par l'eau chlorhydrique à 1/10. Une partie est soluble dans ce liquide, l'autre est insoluble.

a) Dans la *partie soluble* nous avons caractérisé les éléments suivants :

Calcium,
Magnésium,
Aluminium,
Fer,
Manganèse,
Potassium,
Sodium.

Ainsi que l'acide sulfurique et des traces d'acide phosphorique.

b) Dans la *partie insoluble* nous avons caractérisé la silice.

ANALYSE QUANTITATIVE. — Détermination de la proportion de cendres.

Une prise d'essai de 5 grammes de gélose préalablement desséchée, placée dans une capsule en quartz, a été calcinée au rouge sombre et a fourni un poids de cendres de 0 gr. 1395

correspondant à une teneur de 2,79 p. 100. Ces chiffres ont été confirmés au cours des calcinations nécessitées pour l'obtention de quantités suffisantes de cendres en vue du dosage des divers éléments identifiés.

DÉTERMINATION PONDÉRALE DES ÉLÉMENTS CARACTÉRISÉS.

Les éléments dosables sont le calcium, le magnésium, le sodium, le fer, l'aluminium et l'acide sulfurique.

L'acide phosphorique et le potassium existant seulement à l'état de traces faibles n'ont pu faire l'objet de dosages. Les résultats des diverses opérations sont consignés dans le tableau ci-dessous :

A. — Cendres solubles :

Ca	47	p. 100
Mg	11,30	—
Na	2,30	—
Fer et Al.	2	—
SO ⁴ H ⁺	57,35	—
P ⁺ O ³	traces	—
Total	90,15	—

B. — Cendres insolubles :

Silice	9,20	—
Total	99,35	—

Les cendres de la gélose sont surtout formées de calcium et de magnésium combinés à l'acide sulfurique et par le dixième de leur poids de silice. La présence de celle-ci s'explique par la proportion assez considérable de diatomées qui s'incrusteront d'une façon assez profonde dans les algues marines au cours de leur végétation plus ou moins prolongée et que les lavages à l'eau courante ne suffisent pas à entraîner. Viennent ensuite par ordre décroissant : le sodium, l'aluminium et le fer; la recherche du manganèse a été négative.

Réaction des milieux minéralisés.

Pensant que les conditions de développement du bacille pyocyanique pouvaient être influencées par la réaction des milieux solides mis à sa disposition, nous avons cherché à

préciser cette question et avons été amenés à déterminer l'acidité de ces milieux en présence ou non de succinate d'ammoniaque (1) en suivant la technique suivante :

A. — MILIEUX NON ADDITIONNÉS DE SUCCINATE D'AMMONIAQUE.

I. *Gélose non minéralisée.* — 10 cent. cubes de milieu gélosé préalablement liquéfié au bain-marie sont étendus à 50 cent. cubes avec de l'eau distillée chaude. On laisse refroidir, le mélange reste liquide. On y ajoute II gouttes de solution de phénol-phtaléine à 1 p. 100 et on titre avec de la soude N/10. L'addition d'une seule goutte de liqueur alcaline a suffi pour obtenir une teinte rose. Le milieu est sensiblement neutre.

II. *Gélose minéralisée.* — On a procédé de la même façon pour l'essai de la gélose minéralisée. Pour 10 cent. cubes de ce milieu il a fallu employer 0 c.c. 5 de soude N/10.

B. — MILIEUX ADDITIONNÉS DE SUCCINATE D'AMMONIAQUE (2).

A chacun des deux milieux précédemment neutralisés on a ajouté X gouttes de la solution de succinate d'ammoniaque (quantité dont l'emploi a été antérieurement justifié et on a titré de nouveau avec la soude N/10. Dans l'un et l'autre cas, l'addition de 1 cent. cube de liqueur alcaline a été nécessaire pour produire la coloration rosée.

Influence de la réaction sur les milieux envisagés.

Connaissant alors la quantité d'alcali nécessaire pour obtenir des milieux strictement neutres, nous avons préparé plusieurs de ces milieux en employant pour cette neutralisation la soude diluée et nous avons enseimencé comparativement des tubes témoins, non additionnés d'alcali, en étalant à leur surface une même quantité d'émulsion microbienne.

(1) Le succinate d'ammoniaque employé dans toutes nos expériences a été préparé à la Pharmacie Centrale de France.

(2) N. B. — Le succinate d'ammoniaque que l'on trouve dans le commerce a toujours une réaction légèrement acide. Dans le cas actuel, on voit que X gouttes de solution ou 0 gr. 05 de sel exigent 0 c.c. 5 de soude N/10, soit 0 gr. 002 de soude, alors que la saturation totale des 0 gr. 05 aurait nécessité 0 gr. 0263 correspondant à 6 c.c. 6/10 de soude N/10, environ.

Après quarante-huit heures de séjour à l'étuve le développement des cultures était aussi abondant dans chaque série de tubes et la coloration aussi uniforme; ni l'examen macroscopique, ni l'examen microscopique ne permettaient d'établir une différence entre eux. La réaction du milieu intervient donc peu, puisque le microbe se développe aussi bien sur milieu acide que sur milieu alcalin.

D'ailleurs on sait que le bacille pyocyanique peut pousser sur gélose de Dieudonné, milieu très alcalin.

Méthode d'ensemencement.

Dans tous ces essais, la même technique a été suivie; la description en sera donnée plus loin, car il nous a paru utile d'en préciser les détails. Le principe qui nous a guidé était de déposer à la surface de chaque milieu un grand nombre de bacilles en évitant d'entamer la surface du milieu. Cette précaution nous a paru particulièrement indispensable pour le prélèvement des colonies provenant des souches. On voulait ainsi éviter l'entraînement de particules solides et l'incorporation de toute trace de sels étrangers aux milieux ensemencés avec ces colonies; ces additions pouvant, ou provoquer des modifications dans le développement ultérieur des colonies, ou modifier les réactions de coloration et entacher d'erreur les résultats.

La souche originelle ou les souches de repiquage, en bon état de vitalité, sont raclées au moyen d'une pipette Pasteur fermée à son extrémité effilée, en présence d'une petite quantité d'eau bi-distillée stérile de façon à obtenir une émulsion de bacilles. On prélève ensuite avec une autre pipette stérile cette émulsion et on en dépose I à II gouttes soit dans le milieu liquide, soit à la surface du milieu solide, en prenant soin que leur répartition soit aussi complète et uniforme que possible pour chacun des deux milieux envisagés. Dans les cas incertains l'émulsion microbienne a été centrifugée pour éliminer toute trace de succinate d'ammoniaque qui aurait pu intervenir dans la suite.

Puis on porte les milieux ensemencés à l'étuve réglée à $+ 37^{\circ}$ en s'assurant que cette température reste constante, et on doit

éviter qu'elle ne soit dépassée. Les conditions de température nécessaires à la production du pigment ont été mises en évidence par Gessard (1) qui le premier a signalé qu'un chauffage à $+ 57^{\circ}$ fait perdre au microbe sa fonction pyocyanogène, qu'il peut être tué par chauffage à $+ 59^{\circ}$ pendant cinq minutes. Il est donc indispensable de se placer dans des conditions rigoureusement constantes : d'abord pour avoir des résultats toujours comparables, ensuite pour mettre le microbe dans les conditions reconnues les plus favorables à la production du pigment.

RÉSULTATS. — Selon le milieuensemencé et additionné de succinate d'ammoniaque, on observera en même temps que le développement des colonies microbiennes les réactions suivantes :

1° Sur la gélose non minéralisée il y a apparition d'une coloration bleue sans fluorescence ; elle s'étend peu à peu à la totalité du milieu et la culture est peu abondante.

2° Sur le milieu minéral complet il y a production d'une fluorescence verte qui débute à la partie supérieure du milieu pour se propager ensuite à tout le reste et le développement est abondant.

3° Sur milieu liquide (eau + succinate) on obtient après plus de huit jours une solution nettement bleue et limpide, elle ne s'altère pas et peut rester un mois et plus à l'étuve sans prendre la teinte jaune ou feuille morte que l'on observe sur les milieux solides complets.

Les conditions de manifestation de la fluorescence ont été établies d'abord par Gessard (2), puis par Jirou (3). Pour Gessard l'apport d'un phosphate minéral contenu généralement dans les albuminoïdes, d'azote inorganique et d'un hydrate de carbone est indispensable pour qu'elle puisse se produire. Elle n'a pas été observée dans les cultures sur le milieu minéral suivant :

Succinate d'ammoniaque.	5 gr.
Sulfate de magnésie.	2 gr. 50
Eau distillée.	1.000 gr.

(1) C. GESSARD, Des races du Bacille pyocyanique. *Ann. Inst. Past.*, 5, p. 70, 1891.

(2) C. GESSARD, Sur la fonction fluorescigène des microbes. *Ann. Inst. Pasteur*, 6, p. 801, 1892. — Essai sur la biologie du Bacille pyocyanique. *Ann. Inst. Pasteur*, 16, p. 313, 1902.

(3) JIROU, Sur les bacilles fluorescents et le bacille pyocyanique. *Journ. de Physiol.*, 3, p. 188, 1901.

La coloration bleue s'y développe sans mélange de vert fluorescent et la culture pousse peu abondante et difficilement. L'addition de 5 grammes de phosphate de potasse favorise le développement de la culture et la fluorescence apparaît. Gessard a en outre constaté la production d'une culture abondante et fluorescente dans un milieu phosphaté non sucré. Selon cet auteur, deux doses de phosphore entrent en jeu : la première indispensable à la vie constitue la ration d'entretien, la seconde sert pour l'obtention de la fluorescence.

CHAPITRE II

PRODUCTION ET EXTRACTION DE LA PYOCYANINE

En présence des résultats obtenus sur les milieux non minéralisés (solide et liquide) contenant *exclusivement* du succinate d'ammoniaque, il est permis de penser que, seul, ce sel est intervenu dans la production de pyocyanine en même temps que son azote a servi d'aliment au microbe. Nous avons voulu préparer une certaine quantité de ce corps à partir uniquement du succinate d'ammoniaque.

La pyocyanine a été extraite de cultures liquides récentes. Les milieux liquides étaient constitués par de grandes quantités de solutions minérales additionnées de succinate d'ammoniaque dont la composition a été donnée plus haut (1).

Les cultures ont été épuisées avec du chloroforme. Celui-ci dissout la pyocyanine et se colore en prenant une belle coloration bleu ciel foncé, il est ensuite séparé, filtré et agité avec une petite quantité (150 cent. cubes) d'acide sulfurique à 2 p. 100. La pyocyanine passe dans l'eau acidulée à l'état de combinaison rouge. Alors que les cultures et le chloroforme étaient fréquemment renouvelés pour obtenir des nouvelles quantités de pigment et un épuisement très complet, c'est toujours le même volume initial de solution acide (150 cent. cubes) qui a servi à traiter le chloroforme au contact duquel

(1) Ces cultures ont été faites sur milieu au succinate d'ammoniaque pour que la pyocyanine obtenue provienne bien d'un produit parfaitement déterminé.

il s'est enrichi de pyocyanine. Après chaque nouvelle agitation la coloration rouge est devenue plus foncée. Il était indispensable d'opérer ainsi pour éviter dans la suite la concentration même à une température peu élevée d'une trop grande quantité de liqueur acide et prévenir toute cause d'altération de la pyocyanine par la chaleur. La solution aqueuse rouge concentrée puis évaporée dans le vide sulfurique est saturée, après filtration, par du carbonate de soude, qui fait réapparaître la teinte bleue. On filtre de nouveau et on agite avec du chloroforme qui entraîne la pyocyanine et se colore en bleu. Abandonnée à l'évaporation lente, la dissolution chloroformique filtrée laisse de petits cristaux de pyocyanine formant des amas bleu foncé.

Caractérisation de la pyocyanine.

Le produit ainsi isolé est cristallisé en aiguilles bleues ayant en bloc l'aspect de masses lamelleuses mordorées, il présente les caractères principaux donnés par Gessard (1) et notamment les réactions suivantes qui l'assimilent aux alcaloïdes.

Avec l'eau bromée : précipité jaune cristallin.

Avec l'iodure de mercure et de potassium : fines aiguilles bleues soyeuses, groupées en étoiles.

Avec l'iodure de potassium ioduré : précipité brun.

Avec le chlorure d'or : précipité jaune cristallin en forme de feuilles de fougère.

Avec l'acide picrique : aiguilles vertes enchevêtrées en houppes.

Avec l'acide phosphomolybdique : précipité verdâtre.

Nous avons également recherché s'il se comportait comme une base pyrrolique.

Une petite parcelle de substance sèche, chauffée dans un tube à essai à l'orifice duquel est placé un copeau de sapin imprégné d'acide chlorhydrique, n'a produit aucune modification de coloration du copeau. Cette réaction si sensible est donc négative et elle conduit à conclure que la pyocyanine ne contient pas de noyau pyrrolique. Elle distille, d'ailleurs, sous forme de vapeurs lourdes et jaunâtres, ce qui inciterait à

(1) C. GESSARD, De la pyocyanine et de son microbe. *Thèse Doct. Méd.*, Paris, 1882, p. 26.

a lmettre l'idée émise par A. Gautier (1) que cette substance semblerait être un dérivé de l'anthracène.

La nature de ce pigment est donc peu connue et la trop petite quantité recueillie ne nous a pas permis de pousser plus loin les recherches, nous réservant d'y revenir plus tard, d'étendre si possible les connaissances sur sa constitution.

Selon certains auteurs la pyocyanine serait non seulement une substance azotée, mais renfermerait aussi du soufre dans sa molécule, ce qui complique encore l'établissement de la formule de sa composition centésimale.

D'après Ledderhose (2) elle serait représentée par la formule $C^{14}H^{14}N^2O$ établie à la suite de deux déterminations du carbone, de l'hydrogène et de l'azote d'une combinaison avec l'acide picrique.

Madinaveitia (3) a obtenu de la pyocyanine par culture du microbe sur milieu peptoné (peptone de Witte) et glycérimé avec un rendement de 0 gr. 40 de chlorhydrate de pyocyanine pour 3 litres de culture. Cette pyocyanine a été extraite par les méthodes habituelles et il en a fait le chlorhydrate qu'il a purifié par cristallisation dans un mélange d'alcool et d'éther.

La composition de ce corps lui a donné les chiffres suivants :

0,0792 de substance ont fourni 0,1826 de CO^2 et 0,362 d' H^2O .
 0,0820 de substance ont produit 9,50 c. c. de N^2 (27°; 760 mm.).
 0,065 de substance ont produit 0,0386 de $AgCl$.

C	62,88 p. 100	} Calculés pour $C^{60}H^{58}N^{10}Cl^2O^2$
H	5,15 —	
N	12,24 —	
Cl	15,48 —	

Il croit pouvoir de ces données assigner à la pyocyanine la formule suivante $C^{60}H^{58}N^{10}Cl^2O^2$.

L'auteur prétend que la fusion de la pyocyanine avec les alcalis donne des vapeurs colorant en rouge le copeau de sapin imprégné d'acide chlorhydrique ; nous avons répété ces expériences plusieurs fois sans jamais obtenir ce résultat.

(1) ARMAND GAUTIER. *Les toxines microbiennes et animales*, p. 171, 1896.

(2) LEDDERHOSE. Ueber den blauen Eiter. *Tagebl. d. Naturf. Vers. zu Wiesbaden*, 1887, in *Jahres-Ber. d. Maly*, 17, p. 469, 1887.

(3) A. MADINAVEITIA, La Composicion Quimica de la Plocianina. *Ann. Soc. Esp. Fisica y Quimica*, 14, 1916, p. 263.

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE I

CULTURES EN PRÉSENCE DES SELS AMMONIACAUX D'ACIDES ORGANIQUES MONOBASIQUES

Après l'étude de la nutrition du bacille pyocyanique avec le succinate d'ammoniaque soit seul, soit en présence de sels minéraux, nous avons tenté de mettre en expérience les acides de même constitution chimique que l'acide succinique, puis d'autres acides organiques moins complexes.

Mais dans l'exposé des faits, il paraît plus rationnel de présenter cette étude d'abord avec les sels ammoniacaux des acides monobasiques avant ceux des acides bibasiques.

Nous étudierons donc les sels ammoniacaux des acides monobasiques à fonction simple (acides gras saturés d'hydrogène) : acides formique, acétique, propionique, butyrique, valérianique, caproïque, isocaproïque, laurique, myristique, palmitique, stéarique; puis parmi ceux dérivant d'hydrocarbures non saturés, les acides angélique, tiglique, undécylénique, oléique; parmi les acides propioliques : l'acide sorbique et enfin parmi les acides aromatiques et monobasiques, les acides benzoïque et cinnamique.

Pour tous ces essais nous avons toujours donné la préférence aux milieux solides, qui permettent de mieux suivre le développement du microbe; il est plus rapide dans ces conditions que sur les milieux liquides où beaucoup de microbes, lysés au contact de l'eau pure, ne peuvent plus se développer.

On a préparé des solutions aqueuses des sels ammoniacaux de ces acides en tenant compte du poids moléculaire de chacun

d'eux et elles ont été titrées de telle sorte que dans X gouttes, c'est-à-dire dans 0 c. c. 5 il y ait la même quantité d'ammoniaque que dans le volume correspondant de solution de succinate d'ammoniaque (0 gr. 011).

Pour chaque acide mis en expérience cette proportion a été établie de la façon suivante :

Le formiate d'ammoniaque $H-CO^2NH^4$ ayant pour poids moléculaire 63, 63 grammes de ce sel renferment 17 grammes d' NH^3 . La quantité de sel contenant 0 gr. 011 de NH^3 est donc $\frac{63 \times 0,011}{17} = 0 \text{ gr. } 0407$.

Pour la commodité des manipulations nous avons préparé une solution ajustée à un titre tel que X gouttes renferment 0 gr. 011 d'ammoniaque.

Nous avons procédé de la même manière pour tous les autres sels.

Nous reproduisons dans les tableaux ci-dessous les quantités calculées pour chacun d'eux :

I. — ACIDES GRAS MONOBASIQUES.

AMMONIAQUE	FORMULE	POIDS molé- culaire	TENEUR en NH^3	QUANTITÉ de sel contenant 0 gr. 011 d' NH^3	TITRE de la so'lution
Formiate . .	$H - COONH^4$	63	17	0,0407	0,80/10
Acétate . .	$CH^3 - COONH^4$	77	17	0,0498	1/10
Propionate .	$CH^3 - CH^2 - COONH^4$. . .	91	17	0,0586	1,15/10
Butyrate . .	$CH^3 - (CH^2)^2 - COONH^4$. .	105	17	0,0679	1,35/10
Valérianate .	$CH^3 - (CH^2)^3 - COONH^4$. .	119	17	0,077	1,50/10
Caproate . .	$CH^3 - (CH^2)^4 - COONH^4$. .	133	17	0,088	1,75/10
Isocaproate .	$\left\{ \begin{array}{l} (CH^3)^2 = CH - (CH^2)^3 \\ \quad \quad \quad - COONH^4 \end{array} \right\}$	133	17	0,088	1,75/10
Laurate . .	$CH^3 - (CH^2)^{10} - COONH^4$. .	217	17	0,140	2,80/10
Myristate . .	$CH^3 - (CH^2)^{12} - COONH^4$. .	243	17	0,158	3,15/10
Palmitate . .	$CH^3 - (CH^2)^{14} - COONH^4$. .	273	17	0,176	3,50/10
Stéarate . .	$CH^3 - (CH^2)^{16} - COONH^4$. .	301	17	0,197	3,95/10

Les sels des acides laurique, myristique, palmitique et stéarique constituent des masses de consistance pâteuse insolubles dans l'eau. La prise d'essai de ces corps en suspension aqueuse de même que leur répartition homogène dans les milieux supports est donc délicate à réaliser.

II. — ACIDES MONOBASIQUES DE LA SÉRIE GRASSE POSSÉDANT UNE FONCTION ÉTHYLÉNIQUE (Acides oléiques).

AMMONIAQUE	FORMULE	POIDS molé- culaire	TENEUR en NH ³	QUANTITÉ de sel contenant 0 gr. 011 d'NH ³	TITRE de la solution
Angélate (<i>trans</i>).	$\left\{ \begin{array}{l} \text{CH}^3 - \text{CH} \\ \parallel \\ \text{C} - (\text{CH}^3) - \text{CO}^*\text{NH}^4. \end{array} \right\}$	117	17	0,075	1,50/10
Tiglate (<i>cis</i>).	$\left\{ \begin{array}{l} \text{CH} - \text{CH}^3 \\ \parallel \\ \text{C} - (\text{CH}^3) - \text{CO}^*\text{NH}^4. \end{array} \right\}$	117	17	0,075	1,50/10
Undécylénate.	$\text{CH}^2 = \text{CH} - (\text{CH}^2)^9 - \text{CO}^*\text{NH}^4$	201	17	0,130	2,60/10
Oléate (<i>trans</i>).	$\left\{ \begin{array}{l} \text{C}^8\text{H}^{17} - \text{CH} \\ \parallel \\ \text{HC} - (\text{CH}^3)^7 \\ - \text{CO}^*\text{NH}^4. \end{array} \right\}$	299	17	0,193	3,85/10
Elaïdate (<i>cis</i>).	$\left\{ \begin{array}{l} \text{C}^8\text{H}^{17} - \text{CH} \\ \parallel \\ \text{CO}^*\text{NH}^4 - (\text{CH}^3)^7 - \text{CH} \end{array} \right\}$	299	17	0,193	3,85/10

III. — ACIDES PROPIONIQUES RENFERMANT 2 H DE MOINS QUE LES ACIDES OLÉIQUES ET 4 H DE MOINS QUE LES ACIDES GRAS.

Sorbate. . .	$\left\{ \begin{array}{l} \text{CH}^3 - \text{CH} = \text{CH} - \text{CH} = \text{CH} \\ - \text{CO}^*\text{NH}^4. \end{array} \right\}$	129	17	0,083	1,65/10
--------------	--	-----	----	-------	---------

IV. — ACIDES AROMATIQUES MONOBASIQUES.

Acides aromatiques proprement dits :

Benzoate . .	$\text{C}^6\text{H}^5 - \text{CO}^*\text{NH}^4$	139	17	0,089	1,80/10
--------------	---	-----	----	-------	---------

Acides aromatiques possédant une fonction éthylénique.

Cinnamate .	$\text{C}^6\text{H}^5 - \text{CH} = \text{CH} - \text{CO}^*\text{NH}^4.$	165	17	0,106	2,10/10
-------------	--	-----	----	-------	---------

Lesensemencements ont été faits comparativement sur gélose non minéralisée et sur gélose minéralisée additionnées avant leur emploi de X gouttes de la solution ammoniacale de chacun des acides mis en expérience et dans les conditions précédemment exposées au sujet de l'addition du succinate d'ammoniaque dans ces mêmes milieux.

Après un séjour à l'étuve on a constaté :

I. — AVEC LES ACIDES GRAS (saturés d'hydrogène).

AMMONIAQUE	SUR GÉLOSE NON MINÉRALISÉE après 48 heures	SUR GÉLOSE MINÉRALISÉE après 36 heures
Formiate	{ Pas de développement. Pas de coloration.	Pas de développement. Pas de coloration.
Acétate	{ Développement très maigre. Coloration bleue.	Assez bon développement. Coloration verte.
Propionate	{ Très léger développement. Coloration bleue.	Bon développement. Coloration verte.
Butyrate	{ Développement très maigre. Coloration bleue intense.	Bon développement. Coloration verte.
Valérianate	{ Développement faible. Coloration bleue intense.	Bon développement. Coloration verte intense.
Caproate	{ Développement faible. Coloration bleue intense.	Bon développement. Coloration verte intense.
Isocaproate	{ Culture faible. Pas de coloration.	Culture faible. Pas de coloration.
Laurate	{ Développement faible. Légère coloration.	Développement faible. Pas de coloration
Myristate	{ Développement faible. Pas de coloration.	Pas de développement. Pas de coloration.
Palmitate	{ Pas de développement. Pas de coloration.	Pas de développement. Pas de coloration.
Stéarate	{ Culture nulle. Pas de coloration.	Pas de développement. Pas de coloration.

La coloration commence à apparaître au bout de vingt-quatre heures, elle est généralement complète après quarante-huit heures, même pour les milieux sur gélose simple. Dans les cas négatifs le milieu était réensemencé et laissé encore trente-six heures à l'étuve avant de conclure définitivement à un résultat négatif. L'examen, dans ce cas, était répété plusieurs fois et à plusieurs mois d'intervalle.

Nous ne reviendrons plus, par la suite, sur ces temps de séjour à l'étuve.

D'après Aubel (1) le formiate d'ammoniaque est un aliment capable de donner des cultures en milieu synthétique; nous avons recommencé cette expérience plusieurs fois sans obtenir de résultat positif. D'autre part cet auteur (2) a constaté que ce sel ne donne lieu à aucune coloration pigmentaire.

(1) E. AUBEL, Recherches biochimiques sur la nutrition du bacille pyocyanique. *Thèse Doct. Sc.*, Paris, 1922, p. 93.

(2) *Id.*, p. 79.

ESSAI DE DIFFÉRENCIATION DES ACIDES CAPROÏQUE ET ISOCAPROÏQUE.

Frappé de la différence des résultats constatés avec les sels ammoniacaux des acides caproïque et isocaproïque, tous deux isomères, nous avons recherché dans quelles conditions le mélange de ces deux corps pouvait encore donner lieu à la production de la coloration verte observée seulement avec l'acide caproïque. A cet effet nous avons préparé des milieux renfermant des proportions connues de chacun d'eux et les résultats suivants ont été constatés :

SUR GÉLOSE MINÉRALISÉE après 36 heures	
Caproate d'ammoniaque pur, X gouttes . .	{ Bon développement. Coloration verte nette.
Isocaproate d'ammoniaque pur, X gouttes . .	{ Bon développement. Pas de coloration.
{ Caproate d'ammoniaque, I goutte. . . .	Bon développement.
{ Isocaproate d'ammoniaque, IX gouttes . .	Très légère coloration verte.
{ Caproate d'ammoniaque, II gouttes. . . .	Assez bon développement.
{ Isocaproate d'ammoniaque, VIII gouttes .	Coloration verte (faible).
{ Caproate d'ammoniaque, IV gouttes . . .	Bon développement.
{ Isocaproate d'ammoniaque, VI gouttes . .	Coloration verte nette.
{ Caproate d'ammoniaque, V gouttes. . . .	Bon développement.
{ Isocaproate d'ammoniaque, V gouttes . .	Coloration verte très nette.
{ Caproate d'ammoniaque, VI gouttes . . .	Bon développement.
{ Isocaproate d'ammoniaque, IV gouttes . .	Coloration verte très nette.

A plusieurs reprises nous avons pu obtenir des résultats identiques à ceux qui précèdent et observer notamment l'intensité croissante de la coloration verte à mesure qu'augmentait la quantité d'acide caproïque et que décroissait celle d'acide isocaproïque. La manifestation de cette coloration est encore perceptible lorsque le mélange renferme 1/10 d'acide caproïque ; il est permis de penser que ce procédé pourrait être utilisé en chimie comme moyen de diagnose entre ces deux acides. Nous aurons d'ailleurs l'occasion de signaler dans la suite une application analogue de la culture du bacille pyocyanique pour différencier certains acides bibasiques à fonction simple et à double liaison éthylénique.

II. — ACIDES MONOBASIQUES DE LA SÉRIE GRASSE POSSÉDANT UNE FONCTION ÉTHYLÉNIQUE (Acides oléiques).

AMMONIAQUE	SUR GÉLOSE NON MINÉRALISÉE après 48 heures	SUR GÉLOSE MINÉRALISÉE après 36 heures
Angélate (<i>trans</i>). }	Léger développement. Pas de coloration.	Très léger développement. Pas de coloration.
Tiglate (<i>cis</i>). . . }	Très léger développement. Pas de coloration.	Pas de développement. Pas de coloration.
Undécylénate. . }	Très léger développement. Pas de coloration.	Développement intense. Pas de coloration.
Oléate (<i>trans</i>). . }	Léger développement. Pas de coloration.	Léger développement. Pas de coloration.
	(Très légère coloration bleue après plusieurs jours d'étuve.)	
	Pas de développement. Pas de coloration.	Pas de développement. Pas de coloration.
Elaïdate (<i>cis</i>). . }		

III. — ACIDES PROPIONIQUES.

Sorbate. }	Très léger développement. Coloration bleue intense.	Bon développement. Coloration verte.
--------------------	--	---

IV. — ACIDES AROMATIQUES.

Acides aromatiques proprement dits.

Benzoate }	Pas de développement. Pas de coloration.	Dévelop ^t très maigre. Pas de coloration.
--------------------	---	---

Acides aromatiques possédant une fonction éthylénique.

Cinnamate . . . }	Culture maigre. Pas de coloration.	Léger développement. Pas de coloration.
-------------------	---------------------------------------	--

On peut tirer de ces essais la conclusion qu'en général les sels ammoniacaux des acides gras saturés monobasiques peuvent servir au développement du bacille pyocyane qui produit à partir de ces corps de la pyocyane en abondance. Les acides acétique, propionique, butyrique, valérianique et caproïque sont ceux qui conviennent le mieux. On remarquera que ce sont ces acides qui se rencontrent le plus souvent dans les fermentations.

L'acide formique ne se comporte pas comme ses homologues, et cela se conçoit connaissant le pouvoir antiseptique de cet acide.

L'expérimentation est assez difficile à réaliser pour les termes plus élevés de la série, les savons, et l'on peut dire qu'ils ne peuvent servir au développement du bacille pyocyanique; le laurate semble être à la limite des deux groupes des acides gras monobasiques.

Les acides gras non saturés ne peuvent être utilisés par ce micro-organisme, pas plus que les acides aromatiques.

L'acide propiolique toutefois, avec ses deux fonctions éthyléniques, a donné un résultat positif.

Dans tous ces essais, on obtient seulement le pigment bleu sur le milieu non minéralisé, tandis que sur le milieu minéralisé il y a superposition des deux pigments : le bleu et le fluorescent. L'influence des phosphates, signalée par Gessard, dans la production du pigment fluorescent est donc ici complètement démontrée.

Au cours de ce travail, lorsque nous employons le terme « coloration verte », ceci implique qu'il y a les deux colorations.

L'isocaproate pur ne donnant aucune réaction, il est très facile de différencier ce corps du caproate : 10 p. 100 de caproate dans l'isocaproate peuvent ainsi être décelés.

CHAPITRE II

CULTURES EN PRÉSENCE DES SELS AMMONIACAUX D'ACIDES ORGANIQUES BIBASIQUES

Gessard a montré le premier que l'addition de succinate d'ammoniaque était indispensable aux milieux exclusivement minéraux pour la formation du pigment bleu produit par le bacille pyocyanique. Il était naturel de rechercher si ce pigment ne pouvait se former dans les mêmes conditions biologiques en présence des sels ammoniacaux des acides bibasiques de la série succinique.

Les conditions d'utilisation de ces sels étant les mêmes que les précédentes nous reproduisons pour chacun d'eux les quantités calculées pour obtenir des solutions de titre en ammoniaque toujours identique.

Les sels ammoniacaux envisagés ont été les suivants :

AMMONIAQUE	FORMULE	POIDS molé- culaire	TENEUR en NH ³	QUANTITÉ de sel contenant 0 gr. 011 d'NH ³	TITRE de la solution
Fumarate. . .	$\begin{array}{c} \text{CO}^2\text{NH}^4 - \text{CH} \\ \parallel \\ \text{HC} - \text{CO}^2\text{NH}^4 \\ (\text{trans}) \end{array}$	150	34	0,0485	1/10
Maléate. . .	$\begin{array}{c} \text{CH} - \text{CO}^2\text{NH}^4 \\ \parallel \\ \text{CH} - \text{CO}^2\text{NH}^4 \\ (\text{cis}) \end{array}$	150	34	0,0485	1/10
Mésaconate.	$\begin{array}{c} \text{CH}^3 - \text{C} - \text{CO}^2\text{NH}^4 \\ \parallel \\ \text{CO}^2\text{NH}^4 - \text{CH} \\ (\text{trans}) \end{array}$	164	34	0,053	1,05/10
Citraconate ou méthyl- maléate.	$\begin{array}{c} \text{CH}^3 - \text{C} - \text{CO}^2\text{NH}^4 \\ \parallel \\ \text{CH} - \text{CO}^2\text{NH}^4 \\ (\text{cis}) \end{array}$	164	34	0,053	1,05/10
Itaconate ou méthylène- succinate . .	$\begin{array}{c} \text{CO}^2\text{NH}^4 - \text{C} - \text{CH}^3 - \text{CO}^2\text{NH}^4 \\ \parallel \\ \text{CH}^2 \end{array}$	164	34	0,053	1,05/10

Après vingt-quatre heures d'éluve on constate :

AMMONIAQUE	SUR GÉLOSE NON MINÉRALISÉE	SUR GÉLOSE MINÉRALISÉE
Fumarate (trans).	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Développement maigre.} \\ \text{Légère coloration bleue.} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Bon développement.} \\ \text{Coloration verte très nette.} \end{array} \right.$
Maléate (cis) . .	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Développement presque nul.} \\ \text{Très légère coloration bleue.} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Développement nul.} \\ \text{Pas de coloration.} \end{array} \right.$
Mésaconate (trans).	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Développement maigre.} \\ \text{Coloration bleue très nette.} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Bon développement.} \\ \text{Coloration verte nette.} \end{array} \right.$
Citraconate (cis).	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Développement très maigre.} \\ \text{Légère coloration bleue.} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Développement.} \\ \text{Pas de coloration.} \end{array} \right.$
Itaconate ou méthylène- succinate . . .	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Très léger développement.} \\ \text{Coloration bleue intense.} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Développement très net.} \\ \text{Coloration verte très nette.} \end{array} \right.$

Le bacille pyocyanique, ainsi que nous l'avons constaté avec M. Goris (1), peut donc produire son pigment bleu aux dépens des sels ammoniacaux des acides bibasiques envisagés. De plus ce sont les acides en position *trans* qui donnent le pigment

(1) A. GORIS et A. LIOT, Observations sur la culture du bacille pyocyanique sur milieux artificiels définis. C. R. Acad. Sc., 172, 1921, p. 1622.

alors que les acides en position *cis* ne le produisent pas sur le milieu gélosé minéralisé.

Parmi les *acides bibasiques de la série aromatique*, nous avons essayé l'acide phtalique.

AMMONIAQUE	FORMULE	POIDS molé- culaire	TENEUR en NH ³	QUANTITÉ de sel contenant 0 gr. 011 d'NH ³	TITRE de la solution
Phtalate . . .	C ⁶ H ⁴ = (CO ² NH ⁴) ²	200	34	0,0647	1,30/10
AMMONIAQUE	SUR GÉLOSE NON MINÉRALISÉE	SUR GÉLOSE MINÉRALISÉE			
Phtalate.	{ Développement nul. Pas de coloration.	{ Pas de développement. Pas de coloration.			

Les acides bibasiques de la série succinique se montrent donc d'excellents aliments pour le bacille pyocyanique qui donne rapidement et en abondance de la pyocyanine. Il n'y a d'exception que pour le premier terme de la série : l'acide oxalique et aussi pour un homologue de l'acide succinique, l'acide méthylmalonique.

Les acides aromatiques bibasiques ne peuvent servir d'aliments au bacille pyocyanique.

Les acides bibasiques à fonction éthylénique se comportent différemment suivant que l'on ajoute des isomères *cis* ou *trans* au milieu minéralisé : l'isomère *trans* peut servir à la production de pyocyanine contrairement aux isomères *cis*.

Ici, comme pour les acides monobasiques, les cultures sur milieux non minéralisés sont d'un beau bleu et sur milieux minéralisés d'un vert fluorescent masquant la pyocyanine.

CHAPITRE III

CULTURES EN PRÉSENCE DES SELS AMMONIACAUX D'ACIDES ORGANIQUES POSSÉDANT UNE OU PLUSIEURS FONCTIONS OXYGÉNÉES (ALCOOL, PHÉNOL, CÉTONE)

Après les essais de culture en présence des corps possédant une ou plusieurs fonctions acides (saturés ou non saturés d'hydrogène) nous avons poursuivi les expériences en utilisant les acides monobasiques et les acides bibasiques possé-

dant en outre de leurs fonctions acides une ou plusieurs fonctions oxygénées (alcool, phénol, cétone). Puis parmi les termes plus élevés nous avons essayé l'acide citrique.

I. — ACIDES ALCOOLS MONOBASIQUES.

AMMONIAQUE	FORMULE	POIDS molé- culaire	TENEUR en NH^3	QUANTITÉ de sel contenant 0 gr. 011 d NH^3	TITRE de la solution
a) Monoalcooliques.					
Glycolate. .	$\text{CH}^2\text{OH} - \text{CO}^*\text{NH}^4$	95	17	0,060	1,20/10
Lactate [1] (droit). }	$\text{CH}^3 - \text{CHOH} - \text{CO}^*\text{NH}^4$. .	107	17	0,069	1,40/10
Lactate (ra- cémique). }	$\text{CH}^3 - \text{CHOH} - \text{CO}^*\text{NH}^4$. .	107	17	0,069	1,40/10
b) Dialcooliques.					
Glycérate. .	$\text{CH}^2\text{OH} - \text{CHOH} - \text{CO}^*\text{NH}^4$.	123	17	0,0795	1,60/10
c) Pentalcooliques.					
Gluconate. .	$\text{CH}^2\text{OH} - (\text{CHOH})^4 - \text{CO}^*\text{NH}^4$.	213	17	0,1318	2,65/10

II. — ACIDES ACÉTONES MONOBASIQUES.

a) Monocétoniques.					
Pyruvate. .	$\text{CH}^3 - \text{CO} - \text{CO}^*\text{NH}^4$	105	17	0,0678	1,35/10

III. — ACIDES PHÉNOLS MONOBASIQUES.

a) Monophénoliques.					
Salicylate. .	$\text{OH} - \text{C}^6\text{H}^4 - \text{CO}^*\text{NH}^4$. . .	155	17	0,100	2/10
b) Triphénoliques.					
Gallate. . .	$(\text{OH})^3 - \text{C}^6\text{H}^3 - \text{CO}^*\text{NH}^4$. . .	187	17	0,121	2,40/10

IV. — ACIDES ALCOOLS BIBASIQUES.

a) Acides monoalcooliques.					
Malate . . .	$\left\{ \begin{array}{l} \text{CO}^*\text{NH}^4 - \text{CHOH} - \text{CH}^3 \\ \quad \quad \quad - \text{CO}^*\text{NH}^4 \end{array} \right\}$	168	34	0,0543	1,10/10
b) Acides bialcooliques.					
Tartrate . .	$\left\{ \begin{array}{l} \text{CO}^*\text{NH}^4 - (\text{CHOH})^2 \\ \quad \quad \quad - \text{CO}^*\text{NH}^4 \end{array} \right\}$	184	34	0,0595	1,20/10

(1) La préparation de l'acide lactique gauche n'ayant pu être réalisée d'une façon satisfaisante, nous avons préféré ne pas faire d'essai avec le corps obtenu.

AMMONIAQUE	FORMULE	POIDS molé- culaire	TENEUR en NH ³	QUANTITÉ de sel contenant 0 gr. 011 d'NH ³	TITRE de la solution
c) <i>Acides tétralcooliques.</i>					
Mucate . . .	CO ² NH ⁴ —(CHOH) ⁴ —CO ² NH ⁴	244	34	0,0789	1,55/10
Saccharate .	CO ² NH ⁴ —(CHOH) ⁴ —CO ² NH ⁴	244	34	0,0789	1,55/10

V. — ACIDES ALCOOLS TRIBASIQUES ET MONOALCOOLIQUES.

Citrate . . .	$\left. \begin{array}{c} \text{CO}^2\text{NH}^4 - \text{CH}^2 - \text{C} \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{CO}^2\text{NH}^4 \end{array} - \text{CH}^2 - \text{CO}^2\text{NH}^4 \end{array} \right\}$	243	51	0,052	1,05/10
---------------	---	-----	----	-------	---------

Les résultats constatés sont les suivants :

I. — ACIDES ALCOOLS MONOBASIQUES.

AMMONIAQUE	SUR GÉLOSE NON MINÉRALISÉE	SUR GÉLOSE MINÉRALISÉE
a) <i>Monoalcooliques.</i>		
Glycolate. . . .	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Culture maigre.} \\ \text{Pas de coloration.} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Développement maigre.} \\ \text{Pas de coloration.} \end{array} \right.$
Lactate (droit) .	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Culture maigre.} \\ \text{Coloration bleue.} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Bon développement.} \\ \text{Coloration verte nette.} \end{array} \right.$
Lactate (racémique).	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Culture maigre.} \\ \text{Coloration bleue.} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Bon développement.} \\ \text{Coloration verte nette.} \end{array} \right.$
b) <i>Dialcooliques.</i>		
Glycérate. . . .	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Léger développement.} \\ \text{Légère coloration bleue.} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Développement abondant.} \\ \text{Coloration verte très nette.} \end{array} \right.$
c) <i>Pentalcooliques.</i>		
Gluconate	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Culture maigre.} \\ \text{Coloration bleue.} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Très bon développement.} \\ \text{Coloration verte intense} \\ \text{(tendance à teinte feuille} \\ \text{morte).} \end{array} \right.$

II. — ACIDES ACÉTONES MONOBASIQUES.

Monocétoniques.

Pyruvate	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Bon développement.} \\ \text{Légère coloration.} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Culture peu abondante.} \\ \text{Coloration verte très nette.} \end{array} \right.$
------------------	---	---

III. — ACIDES PHÉNOLS MONOBASIQUES.

a) *Monophénoliques.*

Salicylate. . . .	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Culture nulle.} \\ \text{Pas de coloration.} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Très léger développement.} \\ \text{Pas de coloration.} \end{array} \right.$
-------------------	---	--

AMMONIAQUE	SUR GÉLOSE NON MINÉRALISÉE	SUR GÉLOSE MINÉRALISÉE
b) <i>Triphénoliques.</i>		
Gallate	{ Pas de culture. Pas de coloration.	{ Pas de culture. Pas de coloration.

IV. — ACIDES ALCOOLS BIBASIQUES.

a) <i>Monoalcooliques.</i>		
Malate (neutre).	{ Culture maigre. Très légère teinte bleue.	{ Bon développement. Coloration verte.
b) <i>Dialcooliques.</i>		
Tartrate (en milieu légèrement acide).	{ Développement très maigre. Pas de coloration.	{ Bon développement. Pas de coloration.
Tartrate (droit) neutre (1).	{ Maigre développement. Pas de coloration.	{ Assez bon développement. Pas de coloration.
Tartrate (gauche).	{ d° - d°	{ d° d°
Tartrate (racémique).	{ d° d°	{ d° d°
Tartrate (inactif).	{ d° d°	{ d° d°
c) <i>Tétralcooliques.</i>		
Mucate (milieu neutre seulement).	{ Culture nulle. Pas de coloration.	{ Développement presque nul. Pas de coloration.
Saccharate . . .	{ Culture nulle. Pas de coloration.	{ Développement nul. Pas de coloration.

V. — ACIDES ALCOOLS TRIBASIQUES ET MONOALCOOLICIQUES.

Citrate (milieu neutre).	{ Très léger développement. Pas de coloration.	{ Développement maigre. Très légère teinte verte.
Citrate (milieu légèrement acide).	{ Pas de développement. Pas de coloration.	{ Pas de développement. Pas de coloration.

Les acides monobasiques à fonction alcool sont de bons aliments pour le microbe et de bons producteurs de pyocya-

(1) N. B. — Le résultat en présence de tartrate d'ammoniaque neutre nous ayant frappé, l'essai a été refait en présence de tartrate d'ammoniaque légèrement acide, par comparaison avec les essais effectués sur le succinate d'ammoniaque légèrement acide.

nine(1). Il en est de même de l'acide pyruvique à fonction cétonique. Les acides lactique droit et racémique ont donné une réaction positive ; il est à supposer que l'acide lactique gauche se comporterait de même. Ces acides sont ceux que l'on rencontre surtout dans la fermentation des matières sucrées.

Les acides phénoliques monobasiques ont donné un résultat négatif.

Les acides bibasiques à fonction alcoolique, dont tous les atomes de carbone compris entre les deux fonctions acides portent une substitution oxhydrile, ne donnent pas de pyocyanine. Les acides tartrique, droit, gauche, inactif et racémique se sont comportés de la même façon. Au contraire l'acide malonique qui possède un CH^1 sans substitution oxhydrile est assez bon producteur de pyocyanine.

Il ne semble pas que l'isomérisie optique joue ici un rôle comparable à celui trouvé pour l'isomérisie des corps diacides mono-éthyléniques de la série grasse.

L'acide citrique lui-même est tout aussi médiocre aliment que mauvais producteur de pyocyanine.

(1) Toutefois le premier terme de la série (l'acide glycolique) a donné un résultat négatif.

TROISIÈME PARTIE

A la suite de ces essais sur les sels ammoniacaux il nous a paru intéressant de voir si les substances azotées les plus voisines : amines et amides pourraient dans certaines conditions être utilisées par le bacille pyocyannique pour son développement et la production de pyocyanine.

Nous y avons été amené également par une autre considération.

Dans des essais antérieurs l'asparagine avait paru être assez bon aliment pour le bacille pyocyannique ; c'est en voulant nous rendre compte si cette valeur nutritive devrait être rapportée au groupement aminé ou au groupement amidé que nous avons songé à expérimenter les amines et les amides.

CHAPITRE I

CULTURES EN PRÉSENCE D'AMINES

L'expérimentation avec les amines est excessivement difficile à réaliser, car il est impossible d'obtenir ces corps exempts d'ammoniaque, on ne peut guère les utiliser à l'état de bases, et si on veut employer les sels, il faut se servir de sels stables, comme par exemple, le chlorhydrate. Mais nous ferons remarquer que ces composés sont difficilement assimilés par le microbe. Il faudrait, d'après ce qu'ont montré les expériences,

disposer de carbonates ou de sels organiques d'amines absolument exempts d'ammoniaque pour donner un résultat certain.

Les corps mis en expérience dans cette série d'essais ont été les suivants :

CHLORHYDRATES DE	FORMULE	POIDS molé- culaire	TENEUR en azote	QUANTITÉ corres- pondant	TITRE de la solution
				à 0,0092 d'azote	
Monométhylamine . . .	$\text{CH}_3 - \text{NH}^2, \text{HCl}$	67,5	14	0,0443	0,88/10
Diméthylamine	$(\text{CH}_3)^2 - \text{NH}, \text{HCl}$	81,5	14	0,0535	1,07/10
Triméthylamine	$(\text{CH}_3)^3 - \text{N}, \text{HCl}$	95,5	14	0,0499	1/10
Isopropylamine	$\text{C}^3\text{H}^7 - \text{NH}^2, \text{HCl}$	95,5	14	0,0499	1/10
Diéthylamine	$(\text{C}^2\text{H}^5)^2 - \text{NH}, \text{HCl}$	109,5	14	0,0719	1,44/10

Les essais de culture ont été faits en utilisant le sel soit seul, à l'exclusion de toute autre substance, soit en présence de divers hydrates de carbone ajoutés aux milieux supports.

On s'est servi du glucose et du lévulose parmi les substances sucrées; de la glycérine et de la mannite parmi les alcools (X gouttes par tube de solution à 2 p. 100 de chaque substance envisagée).

Dans tous les cas envisagés les résultats ont été négatifs; il n'y a eu ni développement du microbe, ni production de pyocyanine. Les chlorhydrates d'amines ne peuvent donc servir à la production de pyocyanine, employés seuls ou concurremment avec les hydrates de carbone. Il serait alors intéressant de s'adresser à une amine salifiée par un acide organique.

Aubel (1) avait également constaté que les mono-, di-, triméthylamine, la monoéthylamine et la propylamine ne permettaient pas de développement.

CHAPITRE II

CULTURES EN PRÉSENCE D'AMIDES

Dans cette série d'essais les corps azotés offerts au microbe appartiennent soit au groupe des amides (amides des acides monobasiques et bibasiques), soit encore à celui des imides.

Les corps mis en expérience ont été les suivants :

(1) E. AUBEL. *Loc. cit.*, p. 16.

I. — AMIDES DES ACIDES MONOBASIQUES.

NOMS ET SYNONYMIES	POIDS molé- culaire	TENEUR en azote	QUANTITÉ corres- pondant à 0,0092 d'azote	TITRE de la solution
a) <i>Amide de la série grasse.</i>				
Acétamide (Ethanamide). $\text{CH}_3\text{—CO—NH}_2$.	59	14	0,0387	0,80/10
b) <i>Amides de la série aromatique.</i>				
Benzamide $\text{C}_6\text{H}_5\text{—CO—NH}_2$.	121	14	0,0795	1,60/10

II. — AMIDES DES ACIDES POLYBASQUES.

a) <i>Amides carboniques.</i>				
Ac. carbamique (Ac. Aminométhanoïque).				
$\text{H}^+\text{N—CO}^-\text{H}$	61	14	0,040	0,80/10
Carbamide (Urée).				
$\text{NH}_2\text{—CO—NH}_2$	60	28	0,0197	0,40/10
Acide cyanurique (1).				
$\text{CO}\begin{matrix} \text{NH—CO} \\ \text{NH—CO} \end{matrix}\text{NH}$	129	42	0,0282	0,57/10
b) <i>Amidine carbonique.</i>				
Guanidine (carbonate de).				
$\text{NH}=\text{C}\begin{matrix} \text{NH}_2 \\ \text{NH}_2\text{CO}^+\text{H}^2 \end{matrix}$	122	42	0,0265	0,53/10
c) <i>Amides oxaliques.</i>				
Oxamide (éthanediamine).				
$\text{NH}_2\text{—CO—CO—NH}_2$	88	28	0,0289	0,60/10
Acide oxamique (ac. éthanamidoïque).				
$\text{NH}_2\text{—CO—CO}^-\text{H}$	89	14	0,0584	1,15/10
Oxamate d'ammoniaque.				
$\text{NH}_2\text{—CO—CO}^-\text{NH}_4^+$	106	28	0,0348	0,70/10
d) <i>Amide malonique.</i>				
Malonamide (propanediamide).				
$\text{NH}_2\text{—CO—CH}_2\text{—CO—NH}_2$	102	28	0,0335	0,65/10
e) <i>Amides succiniques.</i>				
Succinamide (butanediamide).				
$\text{NH}_2\text{—CO—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CO—NH}_2$.	116	28	0,0381	0,75/10
Succinimide (butanimide).				
$\begin{matrix} \text{CH}_2\text{—CO} \\ \\ \text{CH}_2\text{—CO} \end{matrix}\text{NH} + \text{H}^+\text{O}$	417	14	0,076	1,50/10

(1) Se place ici, car on le considère comme un imide complexe dérivant de l'acide carbonique.

III. — AMIDES DES ACIDES A FONCTION MIXTE.

NOMS ET SYNONYMIES	POIDS molé- culaire	TENEUR en azote	QUANTITÉ corres- pondant à 0,0092 d'azote	TITRE de la solution
a) <i>Amides des amino-acides bibasiques.</i> Asparagine. $\begin{array}{c} \text{NH}_2 - \text{CO} - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CO}^2\text{H} \\ \\ \text{NH}^2 \end{array}$	132	28	0,0433	0,85/10

IV. — AMIDES DES SÉRIES PLUS COMPLEXES.

<i>Amide cholalique de la glycolamine.</i> Acide glycocholique. $\text{C}^{24}\text{H}^{30}\text{O}^4 - \text{NH} - \text{CH}^3 - \text{CO}^2\text{H} \dots$	465	14	0,305	6,10/10
--	-----	----	-------	---------

Résultats :

I. — AMIDES DES ACIDES MONOBASIQUES A FONCTION SIMPLE.

	SUR GÉLOSE NON MINÉRALISÉE	SUR GÉLOSE MINÉRALISÉE
a) Acétamide (1). . .	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Pas de développement.} \\ \text{Pas de coloration.} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Pas de développement.} \\ \text{Pas de coloration.} \end{array} \right.$
b) Benzamide . . .	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Pas de développement.} \\ \text{Pas de coloration.} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Pas de développement.} \\ \text{Pas de coloration.} \end{array} \right.$

II. — AMIDES DES ACIDES POLYBASIQUES.

	SUR GÉLOSE NON MINÉRALISÉE	SUR GÉLOSE MINÉRALISÉE
a) <i>Amides carboniques.</i>		
Acide carbamique. . .	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Culture très maigre.} \\ \text{Pas de coloration.} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Pas de développement.} \\ \text{Pas de coloration.} \end{array} \right.$
Carbamide (urée). . .	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Développement nul.} \\ \text{Pas de coloration.} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Développement nul.} \\ \text{Pas de coloration.} \end{array} \right.$
Acide cyanurique. . .	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Développement nul.} \\ \text{Pas de coloration.} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Développement nul.} \\ \text{Pas de coloration.} \end{array} \right.$
b) <i>Amidine carbonique.</i>		
Guanidine.	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Pas de développement.} \\ \text{Pas de coloration.} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Pas de développement.} \\ \text{Pas de coloration.} \end{array} \right.$

(1) L'acétamide employé a été préparé à l'état de pureté sans trace d'acétate d'ammoniaque; en prolongeant l'expérience, il y aurait eu production de pyocyanine qu'il y a lieu d'attribuer, selon toute vraisemblance, à la formation d'acétate d'ammoniaque par fixation d'eau.

	SUR GÉLOSE NON MINÉRALISÉE	SUR GÉLOSE MINÉRALISÉE
c) <i>Amides oxaliques.</i>		
Oxamide	{ Pas de développement. Pas de coloration.	Pas de développement. Pas de coloration.
Oxamate d'ammoniaque.	{ Développement très maigre. Pas de coloration.	Développem ^t très maigre. Pas de coloration.
d) <i>Amide malonique.</i>		
Malonamide. . .	{ Pas de développement. Pas de coloration.	Pas de développement. Pas de coloration.
e) <i>Amides succiniques.</i>		
Succinamide . .	{ Pas de développement. Pas de coloration.	Pas de développement. Pas de coloration.
Succinimide. . .	{ Léger développement. Pas de coloration.	Léger développement. Pas de coloration.

III. — AMIDES DES ACIDES A FONCTION MIXTE.

a) <i>Amides des amino-acides bibasiques.</i>		
Asparagine . . .	{ Bon développement. Coloration verte (après 24 h.), puis violette (après 36 h.).	Bon développement. Colorat. verte fluorescente.

Ce résultat avec l'asparagine semble être en contradiction avec les résultats obtenus avec toutes les amides. On verra par la suite que lorsqu'on bloque la fonction amine par l'acide chlorhydrique (p. 61) pour ne laisser libre que la fonction amide les résultats sont cette fois négatifs.

IV. — AMIDES DES SÉRIES PLUS COMPLEXES.

Amide cholalique de la glycolamine.

Acide	{ Pas de développement.	Pas de développement.
glycocholique.	{ Pas de coloration.	Pas de coloration.

Ainsi donc les amides employées seules sans addition d'autres substances organiques ne peuvent en général fournir ni développement, ni pyocyamine. Il n'y a d'exception que pour l'asparagine qui renferme un groupement aminé.

Si l'on ajoute au milieu un hydrate de carbone : glycérine, glucose, lévulose, mannite, il se produit un bon développement et une coloration avec l'acétamide et l'urée seulement. On verra plus loin que dans ces conditions ce ne sont pas les amides elles-mêmes qui interviennent, mais que des réactions secondaires se sont produites.

Cultures en présence d'amides additionnées de sucres
ou d'alcools polyatomiques.

Les résultats des essais consignés ci-dessous ayant été négatifs sur gélose minéralisée, c'est-à-dire dans les conditions les plus favorables au développement du microbe, il n'a pas paru nécessaire de reprendre les mêmes essais sur gélose non minéralisée.

Comme précédemment, les sucres mis en expérience ont été le glucose et le lévulose; les alcools choisis ont été la glycérine et la mannite.

Nous présentons ici les résultats obtenus avec les différents corps essayés.

AMIDES DES ACIDES MONOBASIQUES.

a) *Amide de la série grasse.*

SUR GÉLOSE MINÉRALISÉE

Acétamide, Glycérine,	{ Assez bon développement.
— Mannite	{ Coloration verte.
	d°
— Glucose	{ (Légère tendance du milieu à
	{ se décolorer).
— Lévulose.	{ Assez bon développement.
	{ Coloration verte.

b) *Amide de la série aromatique.*

Benzamide, Glycérine	{ Pas de développement.
— Mannite	{ Pas de coloration.
— Glucose	d°
— Lévulose	d°

AMIDES DES ACIDES POLYBASQUES.

SUR GÉLOSE MINÉRALISÉE

a) *Amide carbonique.*

Urée, Glycérine	{ Bon développement 1).
	{ Coloration verte très nette.
— Mannite	d°
— Glucose	d°
— Lévulose	d°

(1) L'explication en sera fournie dans la cinquième partie (voir page 58), en étudiant la valeur nutritive des sucres et des sels ammoniacaux.

b) *Amidine carbonique.*

Guanidine (carbonate de),	Glycérine . . .	{ Pas de développement.
—	—	{ Pas de coloration.
—	Mannite . . .	d°
—	Glucose . . .	d°
—	Lévulose . . .	d°

c) *Amide malonique.*

Malonamide,	Glycérine	{ Pas de développement.
—	—	{ Pas de coloration.
—	Mannite	d°
—	Glucose	d°
—	Lévulose	d°

d) *Amide succinique.*

Succinamide,	Glycérine	{ Pas de développement.
—	—	{ Pas de coloration.
—	Mannite	d°
—	Glucose	d°
—	Lévulose	d°

On voit que d'une façon générale les amides soit seules, soit accompagnées des alcools ou des sucres sont impropres à servir d'aliments au bacille pyocyanique.

L'exception constatée dans le cas de l'acétamide n'est peut-être qu'apparente, les résultats positifs obtenus avec ce corps ne peuvent être considérés comme absolument rigoureux; l'acétamide fixe en effet très facilement l'humidité de l'air en donnant naissance à de l'acétate d'ammoniaque. C'est peut-être à la présence inévitable de ce sel qu'il faut attribuer le développement du bacille et la production de pyocyanine.

N. B. — En présence des résultats négatifs obtenus avec les amides les plus simples et les sucres nous n'avons pas cru devoir faire ces mêmes essais avec l'oxamide, l'acide carbanique, l'acide cyanurique, etc.

CHAPITRE III

Les amines et les amides nous ont conduit à envisager l'emploi, comme source d'azote, des acides aminés qui sont les principes constitutifs des matières albuminoïdes.

CULTURES EN PRÉSENCE D'ACIDES AMINÉS

Les essais ont été effectués avec les différents amino-acides que l'on peut se procurer actuellement. Ces acides aminés ont été mis en solutions aqueuses titrées de telle sorte que la teneur en azote corresponde exactement à celle qui est contenue dans X gouttes de solution de succinate d'ammoniaque à 1/10, c'est-à-dire à 0,092.

Les corps mis en expérience ont été les suivants :

I. — MONOACIDES MONOAMINÉS.

NOMS ET SYNONYMIES		POIDS molé- culaire	TENEUR en azote	QUANTITÉ corres- pondant à 0,0092 d'azote	TITRE de la solution
Glycocolle . . . Glycine ou Ac. amino-acé- tique. $\text{NH}^2 - \text{CH}^2 - \text{CO}^2\text{H}$		75	14	0,0492	1/10
Alanine (droite) . . . Ac. α -amino-propionique dr. $\text{CH}^3 - \underset{\text{NH}^2}{\text{CH}} - \text{CO}^2\text{H}$		89	14	0,0584	1,15/10
Leucine gauche. } Ac. α -amino-isocaproïque. (CH^3) 2 = $\text{CH} - \text{CH}^2 - \text{CH}(\text{NH}^2) - \text{CO}^2\text{H}$		131	14	0,086	1,70/10
Phénylalanine. { $\text{C}^6\text{H}^5 - \text{CH}^2 - \underset{\text{NH}^2}{\text{CH}} - \text{COOH}$		163	14	0,108	2,15/10
Tyrosine . . . { Ac. α -amino- β -p-oxyphényl- propionique. Paraoxyphényl-alanine. $\text{C}^6\text{H}^4 \begin{cases} \text{CH}^2 - \text{CH}(\text{NH}^2) - \text{CO}^2\text{H} \\ \text{OH} \end{cases}$		181	14	0,1189	2,35/10
Histidine . . . β -imidazol-alanine. $\text{NH} \begin{cases} \text{CH} = \text{C} - \text{CH}^2 - \text{CH}(\text{NH}^2) - \text{CO}^2\text{H} \\ \text{CH} = \text{N} \end{cases}$		153	42	0,0339	0,65/10
Tryptophane . . . β . indol-alanine. $\begin{array}{c} \text{CH} \\ \text{H} \diagdown \quad \diagup \text{C} \\ \text{CH} \quad \text{C} - \text{CH}^2 - \text{CH}(\text{NH}^2) - \text{CO}^2\text{H} \\ \text{CH} \quad \text{C} \quad \text{CH} \\ \text{CH} \quad \text{NH} \end{array}$		204	28	0,0670	1,35/10

II. — MONOACIDES DIAMINÉS (ET DÉRIVÉS).

NOMS ET SYNONYMIES	POIDS molé- culaire	TENEUR en azote	QUANTITÉ corres- pondant à 0,0092 d'azote	TITRE de la solution
Lysine (à l'état de bi- chlorhydrate. {				
Ac. α. ε. diamino-caproïque. $\text{HCl, NH}^+ - \text{CH}^2 - (\text{CH}^2)^3 - \underset{\text{NH}^+, \text{HCl}}{\text{CH}} - \text{CO}^2\text{H}$ }	219	28	0,036	0,72/10
Arginine droite. {				
Ac. guanidine-diamino-valérianique. $\text{NH}^+ - \text{C} \begin{smallmatrix} \text{NH} - \text{CH}^2 - (\text{CH}^2)^2 - \text{CH}(\text{NH}^+) \text{CO}^2\text{H} \\ \text{NH} \end{smallmatrix}$ }	174	56	0,0285	0,55/10

III. — DIACIDES MONOAMINÉS.

Ac. aspartique.	Ac. α-amino-succinique.				
$\text{COOH} - \text{CH}^2 - \text{CH}(\text{NH}^+) - \text{COOH}$		133	14	0,0874	1,75/10
Ac. glutamique (droit). {	Ac. α-amino-glutarique d.				
$\text{COOH} - \text{CH}^2 - \text{CH}^2 - \text{CH}(\text{NH}^+) - \text{COOH}$		147	14	0,0966	1,95/10

IV. — ACIDES AMINÉS A NOYAU SULFURÉ.

Acide amino-thiopropionique.

Cystine. . . . Ac. di-α-amino-β-thiopropionique.

$\text{S} - \text{CH}^2 - \text{CH}(\text{NH}^+) - \text{CO}^2\text{H}$	} 240	28	0,079	1,60/10
$\text{S} - \text{CH}^2 - \text{CH}(\text{NH}^+) - \text{CO}^2\text{H}$				

Les résultats observés avec ces corps ont été les suivants :

I. — MONOACIDES MONOAMINÉS.

	SUR GÉLOSE NON MINÉRALISÉE	SUR GÉLOSE MINÉRALISÉE
Glycocolle [1] {	Pas de développement.	Bon développement.
(de l'osséine). {	Pas de coloration.	Pas de coloration.
Alanine (droite). {	Pas de développement.	Bon développement.
	Pas de coloration.	Coloration verte intense.

(1) Le milieu contenant du glycocolle en présence de glucose, de lévulose, de glycérine ou de mannite donne lieu à une culture abondante et à la production de coloration verte. De plus les cultures sur milieu glycocolle-glucose ont tendance à se décolorer.

	SUR GÉLOSE NON MINÉRALISÉE	SUR GÉLOSE MINÉRALISÉE
Alanine	{ Pas de développement.	Bon développement.
(inactive).	{ Pas de coloration.	Coloration verte intense.
Leucine	{ Très maigre développement.	Bon développement.
(gauche).	{ Légère coloration violacée.	Coloration verte.
Phénylalanine: .	{ Développement presque nul.	Très bon développement.
	{ Teinte violacée noirâtre.	Coloration verte intense.
Tyrosine	{ Pas de développement.	Pas de développement.
	{ Pas de coloration.	Pas de coloration.
Histidine	{ Pas de développement.	Bon développement.
	{ Pas de coloration.	Légère coloration verte dans le bas du tube, violette dans le haut.
Tryptophane . .	{ Léger développement.	Maigre développement.
	{ Coloration violacée noirâtre.	Coloration verte noirâtre.

II. — MONOACIDES DIAMINÉS ET DÉRIVÉS.

Lysine	{ Pas de développement.	Pas de développement.
(bichlorhydrate).	{ Pas de coloration.	Pas de coloration.
Arginine	{ Pas de développement.	Bon développement.
	{ Pas de coloration.	Très légère colorat. verte.

III. — DIACIDES MONOAMINÉS.

Acide	{ Très maigre développement.	Léger développement.
aspartique(1).	{ Légère coloration violacée.	Légère coloration verte.
Acide	{ Pas de développement.	Assez bon développement.
glutamique dr.	{ Légère coloration violacée.	Coloration verte.
Aspartate	{ Très maigre développement.	Bon développement.
d'ammoniaque.	{ Légère coloration bleue.	Coloration verte très nette.
Glutamate	{ Très maigre développement.	Bon développement.
d'ammoniaque.	{ Légère coloration bleue.	Coloration verte très nette.
Asparagine . . .	{ Pas de développement.	Léger développement.
	{ Pas de coloration.	Pas de coloration.

IV. — ACIDES AMINÉS A NOYAU SULFURÉ.

	SUR GÉLOSE NON MINÉRALISÉE	SUR GÉLOSE MINÉRALISÉE
<i>Acide amino-thiopropionique.</i>		
Cystine	{ Pas de développement.	Léger développement.
	{ Pas de coloration.	Coloration vert pâle.

(1) Peut-être la cause de ces résultats est-elle due à la forte réaction acide des milieux. Aubel a signalé qu'un excès d'acidité empêche la production de pyocyanine (E. AUBEL, *loc. cit.*, p. 84).

En général les acides aminés semblent de moins bons aliments que les sels ammoniacaux.

Le glyocolle employé seul n'est pas utilisé par le bacille pyocyanique, mais si on le met en présence d'hydrates de carbone : glucose, lévulose, glycérine, mannite, il y a production de pyocyanine.

La leucine, aliment défectueux, d'après Aubel, a permis un bon développement (1). Galimard et Lacomme ont aussi obtenu des cultures avec le glyocolle et la leucine, mais sur milieu complexe contenant de la glycérine (2).

Les autres acides aminés ne donnent pas de pyocyanine ou en donnent très faiblement sur les milieux non minéralisés; sur les milieux minéralisés la production est très nette, sauf pour la tyrosine, contrairement à ce qu'a trouvé Aubel (3). Peut-être l'oxhydrile phénolique jouerait-il le même rôle inhibiteur que l'oxhydrile alcoolique des acides alcools polyatomiques, tel qu'on l'a constaté pour l'acide tartrique.

La lysine à l'état de chlorhydrate et l'arginine sont de médiocres aliments et de médiocres producteurs de pyocyanine.

Dans le cas des acides aminés comme dans celui des acides lactique et tartrique, il semble que l'isomérisation optique n'intervient pas dans la production du phénomène.

(1) E. AUBEL. *Loc. cit.*, p. 15.

(2) J. GALIMARD et L. LACOMME, Les acides aminés comme nouveaux milieux de culture sur milieux chimiquement définis pour l'étude des microbes. *Journ. de Phys. et de Path. gén.*, 9, p. 481, 1907.

(3) E. AUBEL. *Loc. cit.*, p. 15.

QUATRIÈME PARTIE

On a vu par ce qui précède que les sels ammoniacaux des acides organiques sont en général de bons aliments pour le bacille pyocyanique. Nous avons alors essayé la nutrition de ce bacille en présence des sels minéraux, pris sans aucune addition d'autres substances organiques. Comme les résultats furent négatifs, ce qui était d'ailleurs à prévoir, nous avons ensuite ajouté à ces sels ammoniacaux des substances hydrocarbonées diverses. La différence des résultats obtenus par la culture du bacille sur l'urée et sur le glycocolle, en présence ou en l'absence d'hydrates de carbone, nous engageait d'ailleurs à faire cet essai.

Mais auparavant nous avons voulu voir comment se comportait le bacille en présence de diverses substances hydrocarbonées employées seules.

Ce sont les résultats obtenus qui vont être exposés dans les trois chapitres suivants.

CHAPITRE I

CULTURES EN PRÉSENCE DE SELS AMMONIACAUX MINÉRAUX

Le titre des solutions de sels ammoniacaux correspondait à celui de la solution initiale de succinate d'ammoniaque, c'est-à-dire que X gouttes avaient une teneur en ammoniaque équivalant à 0 gr. 011.

NATURE DU SEL	FORMULE	POIDS molé- culaire	TENEUR en NH ³	QUANTITÉ de sel corres- pondant	TITRE de la solution
				à 0,011 d'NH ³	
Carbonate d'ammoniaque . . .	CO ² (NH ⁴) ² .	96	34	0,031	0,65/10
Chlorhydrate d'ammoniaque . .	NH ⁴ Cl.	53,5	17	0,0346	0,80/10
Sulfate d'ammoniaque	SO ⁴ (NH ⁴) ² .	132	34	0,0427	0,85/10
Azotate d'ammoniaque	NO ³ NH ⁴ .	80	17	0,0518	1/10
Phosphate d'ammoniaque . . .	PO ⁴ H ² (NH ⁴) ² .	115	17	0,0744	0,15/10

Les résultats constatés ont été les suivants :

AMMONIAQUE	SUR GÉLOSE NON MINÉRALISÉE	SUR GÉLOSE MINÉRALISÉE
Carbonate	{ Pas de développement. Pas de coloration.	Léger développement. Pas de coloration.
Chlorhydrate . . .	{ Pas de développement. Pas de coloration.	Légère culture. Pas de coloration.
Sulfate	{ Pas de développement. Pas de coloration.	Légère culture. Pas de coloration.
Azotate	{ Pas de développement. Pas de coloration.	Culture très maigre. Pas de coloration.
Phosphate	{ Pas de développement. Pas de coloration.	Léger développement. Pas de coloration.

Les résultats sont négatifs. Le faible développement des cultures constaté semble dû à la parcelle de substances nutritives apportées par les III gouttes de liquide ayant servi à ense-
mencer et qui ont été étalées à la surface de la gélose.

CHAPITRE II

CULTURES

EN PRÉSENCE D'ALCOOLS POLYATOMIQUES OU DE SUCRES

Nous avons mis en expérience la série des corps suivants :

- 1° Des alcools polyatomiques ;
- 2° Des monoses ;
- 3° Des trioses et des polyoses.

Les milieux ont été préparés en ajoutant à la gélose non minéralisée et à la gélose minéralisée X gouttes, par tube, de solution à 2 p. 100 des diverses substances hydrocarbonées.

Voici les résultats constatés :

I. — CULTURES EN PRÉSENCE D'ALCOOLS POLYATOMIQUES.

	SUR GÉLOSE non minéralisée	SUR GÉLOSE minéralisée
a) <i>Alcools triatomiques.</i>		
Glycérine	{ Culture nulle.	Culture maigre.
$\text{CH}^2\text{OH} - \text{CHOH} - \text{CH}^2\text{OH}$	{ Pas de coloration.	Pas de coloration.
b) <i>Alcools tétratomiques.</i>		
Erythrite	{ Culture nulle.	Cult ^{re} très maigre.
$\text{CH}^2\text{OH} - (\text{CHOH})^2 - \text{CH}^2\text{OH} . . .$	{ Pas de coloration.	Pas de coloration.
c) <i>Alcools hexatomiques.</i>		
Mannite	{ Culture nulle.	Culture maigre.
$\text{CH}^2\text{OH} - (\text{CHOH})^4 - \text{CH}^2\text{OH} . . .$	{ Pas de coloration.	Pas de coloration.
Sorbite	{ Culture nulle.	Culture nulle.
$\text{CH}^2\text{OH} - (\text{CHOH})^4 - \text{CH}^2\text{OH} . . .$	{ Pas de coloration.	Pas de coloration.
Dulcité	{ Culture nulle.	Cult ^{re} très maigre.
$\text{CH}^2\text{OH} - (\text{CHOH})^4 - \text{CH}^2\text{OH} . . .$	{ Pas de coloration.	Pas de coloration.
d) <i>Alcools heptatomiques.</i>		
Volémité	{ Culture nulle.	Cult ^{re} très maigre.
$\text{CH}^2\text{OH} - (\text{CHOH})^5 - \text{CH}^2\text{OH} . . .$	{ Pas de coloration.	Pas de coloration.
Perséité	{ Pas de développ ^t .	Pas de développ ^t .
$\text{CH}^2\text{OH} - (\text{CHOH})^5 - \text{CH}^2\text{OH} . . .$	{ Pas de coloration.	Pas de coloration.

II. — CULTURES EN PRÉSENCE DES MONOSACCHARIDES.

a) <i>Pentoses.</i>		
Arabinose	{ Pas de développ ^t .	Pas de développ ^t .
$\text{CH}^2\text{OH} - (\text{CHOH})^3 - \text{CHO}$	{ Pas de coloration.	Pas de coloration.
Xylose	{ d ^o	d ^o
$\text{CH}^2\text{OH} - (\text{CHOH})^3 - \text{CHO}$	{ d ^o	d ^o
b) <i>Méthylpentose.</i>		
Rhamnose	{ Pas de développ ^t .	Pas de développ ^t .
$\text{CH}^2 - (\text{CHOH})^4 - \text{CHO}$	{ Pas de coloration.	Pas de coloration.
c) <i>Hexoses.</i>		
Glucose	{ Pas de développ ^t .	Pas de développ ^t .
$\text{CH}^2\text{OH} - (\text{CHOH})^4 - \text{CH}_2\text{O}$	{ Pas de coloration.	Pas de coloration.
Galactose	{ d ^o	d ^o
$\text{CH}^2\text{OH} - (\text{CHOH})^4 - \text{CHO}$	{ d ^o	d ^o
Mannose	{ d ^o	d ^o
$\text{CH}^2\text{OH} - (\text{CHOH})^4 - \text{CHO}$	{ d ^o	d ^o
Lévulose	{ d ^o	d ^o
$\text{CH}^2\text{OH} - (\text{CHOH})^3 - \text{CO} - \text{CH}^2\text{OH} .$	{ d ^o	d ^o

III. — CULTURES EN PRÉSENCE DE POLYSACCHARIDES.

1° BIOSES.

a) *Pento-hexobioses :*

Primevérose $[\text{C}^{14}\text{H}^{30}\text{O}^{10}]$	{ Pas de développ ^t .	Pas de développ ^t .
Glucose + xylose.	{ Pas de coloration.	Pas de coloration.

	SUR GÉLOSE non minéralisée	SUR GÉLOSE minéralisée
b) <i>Hexobioses</i> :		
Saccharose [$C^{12}H^{22}O^{11}$]	{ Pas de développ.	Pas de développ.
Glucose + lévulose.	{ Pas de coloration.	Pas de coloration.
Lactose [$C^{12}H^{22}O^{11} + H^2O$]	{ d°	d°
Glucose + galactose	{ d°	d°
Maltose [$C^{12}H^{22}O^{11} + H^2O$]	{ d°	d°
Glucose + glucose	{ d°	d°
Tréhalose [$C^{12}H^{22}O^{11} + 2H^2O$]	{ d°	d°
Glucose + glucose	{ d°	d°

2° TRIOSES.

Hexotriosos :

Raffinose [$C^{18}H^{32}O^{16} + 5H^2O$]	{ d°	d°
Lévulose + glucose + galactose. }	d°	d°

Les résultats sont entièrement négatifs, les diverses substances hydrocarbonées employées seules ne peuvent servir d'aliment au bacille pyocyanique.

Wassersug (1) avait d'ailleurs constaté que les sucres empêchent la formation de la pyocyanine et Aubei (2) a montré que les hydrates de carbone gênent ou entravent l'élaboration du pigment par acidification du milieu.

CHAPITRE III

CULTURES EN PRÉSENCE DE SELS AMMONIACAUX MINÉRAUX ET DE SUBSTANCES ORGANIQUES TERNAIRES (ALCOOLS OU SUCRES)

Les milieux utilisés ont été préparés comme précédemment en incorporant à la gélose non minéralisée et à la gélose minéralisée X gouttes, par tube, de solution à 2 p. 100 des diverses substances hydrocarbonées en suivant l'ordre adopté dans le chapitre précédent; puis à ces milieux il a été ensuite ajouté des quantités calculées de sels ammoniacaux minéraux de telle façon qu'il n'y ait que 0,011 d'ammoniaque par milieu.

(1) E. WASSERSUG, Sur la formation de la matière colorante chez le *Bacillus pyocyanus*. *Ann. Inst. Pasteur*, **1**, p. 586, 1887.

(2) E. AUBEI. *Loc cit.*, p. 83.

I. — CULTURES EN PRÉSENCE DE SELS AMMONIACAUX MINÉRAUX
ET D'ALCOOLS POLYATOMIQUES. —

AMMONIAQUE	SUR GÉLOSE non minéralisée	SUR GÉLOSE minéralisée
a) <i>Alcools triatomiques.</i>		
Glycérine + Carbonate	{ Pas de culture. Pas de coloration.	Culture moyenne. Légère coloration.
— + Chlorhydrate.	{ d° d°	Cult ^{re} assez abond. Pas de coloration.
— + Sulfate.	{ d° d°	Cult ^{re} assez abond. Très légère color.
— + Azotate	{ d° d°	Cult ^{re} abondante. Coloration verte.
— + Phosphate	{ d° d°	Cult ^{re} abondante. Color. jaune verd. (cette teinte est fréquente avec le phosphate).

Avec les homologues de la glycérine : méthyl-, éthyl-, propyl-glycérine les cultures sont maigres ou nulles et il n'y a pas de coloration; toutefois en présence de nitrate le développement s'est montré plus apparent.

b) <i>Alcools tétratomiques.</i>		
Erythrite + Carbonate	{ Culture nulle. Pas de coloration.	Cult ^{re} très maigre. Pas de coloration.
— + Chlorhydrate.	{ d° d°	Cult ^{re} très maigre. Pas de coloration.
— + Sulfate.	d°	d°
— + Azotate.	d°	d°
— + Phosphate	d°	d°

c) <i>Alcools hexatomiques.</i>		
Dulcité + Carbonate	{ Pas de culture. Pas de coloration.	Culture maigre. Pas de coloration.
— + Chlorhydrate.	d°	d°
— + Sulfate.	d°	d°
— + Azotate	d°	d°
— + Phosphate	d°	d°
Mannite + Carbonate	{ Pas de culture. Pas de coloration.	Bon développem. Coloration verte très nette.
— + Chlorhydrate.	{ d° d°	Bon développem. Pas de coloration.
— + Sulfate.	{ d° d°	Bon développem. Très légère color.

AMMONIAQUE	SUR GÉLOSE non minéralisée	SUR GÉLOSE minéralisée
Mannite + Azotate	{ Pas de coloration. d°	Bon développem ^t . Color. verte nette.
— + Phosphate	{ d° d°	Bon développem ^t . Color. jaune verd.
Sorbitol + Carbonate	{ Pas de développ ^t . Pas de coloration.	Culture nulle. Pas de coloration ^t .
— + Chlorhydrate	d°	d°
— + Sulfate	d°	d°
— + Azotate	d°	d°
— + Phosphate	d°	d°

c) *Alcools heptomiques.*

Perséite + Carbonate	{ Très maigre développ ^t . Pas de coloration.	Très maigre développ ^t . Pas de coloration.
— + Azotate	d°	d°
— + Chlorhydrate	d°	d°
— + Sulfate	d°	d°
— + Phosphate	d°	d°
Volémite + Carbonate	{ Pas de développ ^t . Pas de coloration.	Pas de développ ^t . Pas de coloration.
— + Chlorhydrate	d°	d°
— + Azotate	d°	d°
— + Sulfate	d°	d°
— + Phosphate	d°	d°

En général dans ces essais les cultures ont été très maigres ou presque nulles.

II. — CULTURES EN PRÉSENCE DE SELS AMMONIACaux MINÉRAUX ET DE MONOSES.

a) *Pentoses.*

Arabinose + Carbonate	{ Pas de développ ^t . Pas de coloration.	Pas de développ ^t . Pas de coloration.
— + Chlorhydrate	d°	d°
— + Azotate	d°	d°
— + Sulfate	d°	d°
— + Phosphate	d°	d°
Xylose + Carbonate	{ Pas de développ ^t . Pas de coloration.	Pas de développ ^t . Pas de coloration.
— + Chlorhydrate	d°	d°
— + Azotate	d°	d°
— + Sulfate	d°	d°
— + Phosphate	d°	d°

b) *Hexoses.*

Glucose + Carbonate	{ Pas de développ ^t . Pas de coloration.	Bon développ ^t . Coloration verte très nette.
-------------------------------	--	--

AMMONIAQUE	SUR GÉLOSE non minéralisée	SUR GÉLOSE minéralisée
Glucose + Chlorhydrate	{ Pas de coloration.	Bon développ ^t .
— + Sulfate	{ d ^o	Pas de coloration.
— + Azotate	{ d ^o	Bon développ ^t .
— + Phosphate	{ d ^o	Très légère color.
Galactose + Carbonate	{ Pas de développ ^t .	Bon développ ^t .
— + Chlorhydrate	{ Pas de coloration.	Pas de développ ^t .
— + Sulfate	{ d ^o	d ^o
— + Azotate	{ d ^o	d ^o
— + Phosphate	{ d ^o	d ^o
Mannose + Carbonate	{ Pas de développ ^t .	Pas de développ ^t .
— + Chlorhydrate	{ Pas de coloration.	Pas de coloration.
— + Sulfate	{ d ^o	d ^o
— + Azotate	{ d ^o	d ^o
— + Phosphate	{ d ^o	d ^o
Lévulose + Carbonate	{ Pas de développ ^t .	Bon développ ^t .
— + Chlorhydrate	{ Pas de coloration.	Coloration verte très nette.
— + Sulfate	{ d ^o	Bon développ ^t .
— + Azotate	{ d ^o	Pas de coloration.
— + Phosphate	{ d ^o	Bon développ ^t .
	{ d ^o	Légère col. verte.
	{ d ^o	Bon développ ^t .
	{ d ^o	Coloration verte.
	{ d ^o	Bon développ ^t .
	{ d ^o	Color. jaune verd.

III. — CULTURES EN PRÉSENCE DE SELS AMMONIACAUX MINÉRAUX ET DE POLYSACCHARIDES.

1^o BIOSES.

a) *Pento-hexobioses.*

Primevérose + Carbonate	{ Pas de développ ^t .	Pas de développ ^t .
— + Chlorhydrate	{ Pas de coloration.	Pas de coloration.
— + Sulfate	{ d ^o	d ^o
— + Azotate	{ d ^o	d ^o
— + Phosphate	{ d ^o	d ^o

b) *Hexobioses.*

Saccharose + Carbonate	{ Pas de développ ^t .	Cult ^{re} très maigre.
— + Chlorhydrate	{ Pas de coloration.	Pas de coloration.
— + Sulfate	{ d ^o	d ^o
— + Azotate	{ d ^o	d ^o
— + Phosphate	{ d ^o	d ^o

AMMONIAQUE	SUR GÉLOSE non minéralisée	SUR GÉLOSE minéralisée
Lactose + Carbonate	{ Pas de développ ^t .	Cult ^{re} très maigre.
— + Chlorhydrate	{ Pas de coloration.	Pas de coloration.
— + Sulfate	d ^o	d ^o
— + Azotate	d ^o	d ^o
— + Phosphate	d ^o	d ^o
Maltose + Carbonate	{ Pas de développ ^t .	Cult ^{re} très maigre.
— + Chlorhydrate	{ Pas de coloration.	Pas de coloration.
— + Sulfate	d ^o	d ^o
— + Azotate	d ^o	d ^o
— + Phosphate	d ^o	d ^o

2^o TRIOSES.

Hexotrioses.

Raffinose + Carbonate	{ Pas de développ ^t .	Très légère cult ^{re} .
— + Chlorhydrate	{ Pas de coloration.	Pas de coloration.
— + Sulfate	d ^o	d ^o
— + Azotate	d ^o	d ^o
— + Phosphate	d ^o	d ^o

En résumé on peut dire que, d'une manière générale, les alcools polyatomiques, sauf la glycérine et la mannite, mis en présence des sels ammoniacaux minéraux sont de mauvais aliments pour le bacille pyocyanique.

Parmi les monoses, seuls le glucose et le lévulose sont de bons aliments.

Les polysaccharides (bioses et trioses) sont de très mauvais aliments, le bacille ne renfermant probablement pas de diastase pouvant dédoubler ces sucres. M. Aubel avait déjà constaté le même fait (1).

Il y a production de pyocyanine avec les substances suivantes : glycérine, mannite, glucose, lévulose, additionnées de carbonate ou d'azotate d'ammoniaque.

La mannite peut être attaquée, mais en présence de substances capables de donner de l'ammoniaque, pouvant se combiner avec les acides provenant de l'oxydation de cette mannite. Employée seule, elle ne peut servir d'aliment comme l'avait déjà indiqué Aubel (2).

(1) E. AUBEL. *Loc. cit.*, p. 11.

(2) *Id.*, p. 18.

On obtient des cultures assez riches sur les milieux contenant glycérine, mannite, glucose, lévulose et les sels tels que sulfate, phosphate, chlorhydrate. La pyocyanine apparaît sur ces milieux d'une façon inconstante et très irrégulière, quelquefois avec le phosphate et le sulfate ; elle n'apparaît jamais avec le chlorhydrate. Les expériences positives sont d'ailleurs assez rares.

CINQUIÈME PARTIE

EXPOSÉ CRITIQUE DES RÉSULTATS OBTENUS

Il reste maintenant à envisager s'il ne serait pas possible par la comparaison de tous les faits acquis, par le rapprochement de certains résultats, de condenser en une synthèse tous les phénomènes constatés afin de faire ressortir les conditions biologiques nécessaires au développement du bacille pyocyanique et à la production de son pigment.

Les résultats obtenus par les essais de nutrition du bacille pyocyanique sur les milieux contenant des sels ammoniacaux minéraux, additionnés de sucres, nous ont suggéré l'idée que les *sels ammoniacaux à acides organiques seuls* étaient un aliment nécessaire au développement du microbe et indispensable à la production de la pyocyanine.

En admettant cette hypothèse, tous les faits précédents s'expliquent très facilement.

Lorsque l'on cultive le bacille pyocyanique sur glucose, lévulose, glycérine ou mannite, il s'y développe modérément, mais on ne connaît pas les modifications qu'il a fait subir à la molécule sucrée. On peut toutefois constater que si l'on fait cette culture sur gélose minéralisée, additionnée de tournesol, celle-ci vire au rouge, preuve de la production d'acides. Le virage est surtout accentué pour le glucose, qui doit peut-être donner une plus grande quantité de ces acides.

Vourloud (1) avait déjà constaté, en cultivant le bacille pyo-

(1) VOURLOUD (de Lausanne), Action de quelques bactéries sur les hydrates de carbone et le lait tournesolé (mém. en français). *Centr. für Bakt.*, 45, p. 198, 1908.

cyanique sur agar tournesolé à 2 p. 100 et sucré à 1 p. 100, que le milieu virait avec la glycérine, le xylose, l'arabinose, le galactose; il restait bleu avec le lévulose, le glucose et le maltose.

Reprenant ces essais, en modifiant toutefois la technique de stérilisation des sucres, Aubel (1) a obtenu des résultats ne concordant pas absolument avec ceux de Vourloud : pas d'attaque des bioses, du maltose notamment, tandis que le glucose, le lévulose et la glycérine étaient attaqués. L'étude plus spéciale de l'action du bacille pyocyanique sur les sources carbonées lui a permis d'établir, en outre, que les acides provenant de la transformation du glucose sont vraisemblablement constitués par un mélange d'acides formique et acétique; ceux qui proviennent du lévulose seraient également formés par le mélange des mêmes acides avec, en outre, de l'acide lactique; la glycérine fournirait également les acides formique et acétique.

Les acides organiques ainsi formés s'unissent au carbonate d'ammoniaque, ajouté au milieu, pour donner le sel ammoniacal nécessaire à la production de la pyocyanine.

Avec l'azotate, il y a une action du même genre, le bacille pyocyanique est un dénitrifiant énergique, ainsi que l'ont déjà signalé Weissenberg (2), puis Wolf (3) et c'est pourquoi Grimbert (4) le classe parmi les ferments dénitrifiants directs; si on le cultive en milieu aqueux contenant de l'azotate de potasse ou d'ammoniaque et un sucre, on ne tardera pas à constater que le liquide donne la réaction des nitrites, la réaction peut être menée jusqu'au terme ammoniacque. Dans ces conditions, il y a formation de sels ammoniacaux avec les acides provenant des sucres et par suite production de pyocyanine.

Les résultats constatés avec le phosphate, le sulfate et le chlorhydrate pourraient s'expliquer par ce fait que ces différents acides sont dans un état plus ou moins grand de dissociation et que, dans ces conditions, il peut se former un double échange, avec formation de sel ammoniacal organique qui

(1) E. AUBEL. *Loc. cit.*, p. 40.

(2) WEISSENBERG, Studien über Denitrification. *Archiv für Hyg.*, 30, p. 274, 1897.

(3) WOLF. In *Centralbl. f. Bakt.*, 2. Abt., 5, p. 682, 1899, et 6, p. 160, 1899, cité par Grimbert dans le mémoire ci-dessous (n° 4).

(4) L. GRIMBERT, Les bactéries dénitrifiantes et le mécanisme de la dénitrification. *Bull. Inst. Pasteur*, 2, 942. 1904.

pourra alors intervenir. La réaction devra particulièrement mieux se faire avec le sucre susceptible de donner le plus d'acides, par conséquent avec le glucose. De là les résultats inconstants que l'on observe dans les essais de culture du bacille en présence du phosphate, du sulfate et des matières sucrées.

En présence du chlorhydrate les réactions de coloration se sont toujours montrées négatives, fait dont l'explication rationnelle nous échappe actuellement.

Si cette opinion est exacte, on a plusieurs moyens de la contrôler.

Tout d'abord il suffira de préparer un *milieu sucré et d'y ajouter de l'ammoniaque* pour que la réaction puisse se produire. On disposera alors l'expérience suivante : à des tubes de gélose minéralisée, additionnée de substances hydrocarbonées : glucose, lévulose, glycérine, mannite, on ajoutera de l'ammoniaque N 10 dans une proportion telle que le liquide renferme 0,0055 d'ammoniaque (1).

La solution sera ajoutée lorsque les tubes de gélose seront sur le point de se solidifier. On les bouchera bien pour éviter l'évaporation de l'ammoniaque. Dès que la gélose inclinée sera refroidie, ces tubes serontensemencés et portés à l'étuve réglée à 35-36°, de façon à diminuer l'évaporation de l'ammoniaque.

La quantité d'ammoniaque pure, ajoutée à chaque milieu, correspondait à 0 gr. 0055 d'ammoniaque; celle de substance hydrocarbonée était X gouttes de solution à 2 p. 100.

CULTURES EN PRÉSENCE D'HYDRATES DE CARBONE ET D'AMMONIAQUE PURE.

On a obtenu les résultats suivants :

Sur gélose minéralisée additionnée de Glucose.	}	Culture abondante.	
		Coloration verte très faible.	
— — — — —		Lévulose . . .	d°
— — — — —		Mannite . . .	d°
— — — — —		Glycérine . . }	Pas de modification du milieu.

(1) La quantité d'ammoniaque devrait être 0 gr. 011 pour se placer dans les conditions précédemment réalisées, mais en opérant ainsi le milieu serait trop alcalin et c'est pourquoi cette dose a été réduite de moitié.

On constate avec le glucose, le lévulose ou la mannite un développement lent du micro-organisme, mais au bout de quatre jours on observe une teinte légèrement verdâtre et au bout de cinq jours une coloration verte très nette.

Il a fallu un certain temps au microbe pour se développer et produire l'acide nécessaire à la neutralisation de l'ammoniaque, mais une fois le sel formé, la production de pyocyanine s'est accentuée rapidement.

Il est, en outre, un autre moyen de contrôle, c'est l'expérience relatée dans nos essais de nutrition *avec les amides en présence d'hydrates de carbone*. On a vu que dans ces conditions l'urée et l'acétamide donnaient une coloration verte; ce fait n'a rien d'extraordinaire avec l'acétamide qu'il est très difficile d'obtenir pur et qui, même en cet état, se transforme assez rapidement en acétate d'ammoniaque, ramenant ainsi au cas général.

Il reste à expliquer la réaction positive avec l'urée. Or le bacille pyocyanique renferme de l'uréase : si l'on délaie dans une solution d'urée le raclage d'un tube de culture de bacille pyocyanique, le liquide ne tarde pas à devenir de plus en plus alcalin par production de carbonate d'ammoniaque.

De sorte que le cas est analogue à celui des cultures de bacille pyocyanique en présence d'hydrates de carbone et de carbonate d'ammoniaque dans lesquelles la production d'un sel ammoniacal organique peut se réaliser. S'il en est ainsi, parmi les amides, seule l'urée est susceptible de produire la pyocyanine en présence des hydrates de carbone et parmi ceux-ci le glucose, le lévulose, la glycérine, la mannite peuvent être utilisés.

Nous avons alors disposé les expériences suivantes, en ajoutant aux milieux envisagés les mêmes quantités d'urée et d'hydrates de carbone que dans les essais effectués avec chacune de ces substances prise isolément.

CULTURES EN PRESENCE D'URÉE ET D'HYDRATES DE CARBONE.

	SUR GÉLOSE NON MINÉRALISÉE	SUR GÉLOSE MINÉRALISÉE
Urée	Pas de développement. Coloration nulle.	Pas de développement. Pas de coloration.

	SUR GÉLOSE NON MINÉRALISÉE	SUR GÉLOSE MINÉRALISÉE
<i>Streptococcus lactis</i>	Très maigre développement. Teinte à peine bleutée.	Bon développement. Coloration verte nette.
Lévulose + urée	d°	d°
Glycérine + urée	d°	d°
Mannite + urée	d°	d°
Dulcité + urée	d°	Très maigre développement.
Saccharose	d°	Pas de coloration.
+ urée.	Pas de développement.	d°
Lactose + urée	Pas de coloration.	d°
Maltose + urée	d°	d°

Le glycocollie se comporte comme l'urée: employé seul il ne donne pas de pyocyanine; additionné de glucose, lévulose, glycérine ou mannite, la coloration apparaît. Il faut donc en conclure que la fonction amine n'a pas servi et qu'il y a eu, comme dans le cas de l'urée, formation de sels ammoniacaux.

Ceci nous conduit à admettre que ce n'est pas la *fonction amine de l'acide aminé qui intervient, mais la fonction sel ammoniacal* qui se produit au cours du développement du microbe; celui-ci prenant le groupe NH^2 pour produire de l'ammoniaque qui se transporte à l'extrémité de la chaîne pour former le sel ammoniacal nécessaire. Ainsi dans l'alanine $\text{CH}^3 - \text{CH}(\text{NH}^2) - \text{COOH}$ il y aura transport du groupe NH^2 et formation probable de lactate d'ammoniaque $\text{CH}^3 - \text{CHOH} - \text{COONH}^4$ ou encore de propionate d'ammoniaque $\text{CH}^3 - \text{CH}^2 - \text{COONH}^4$ ou de pyruvate d'ammoniaque $\text{CH}^3 - \text{CO} - \text{CO}^2\text{NH}^4$; de même l'acide aspartique $\text{COOH} - \text{CH}^2 - \text{CH}(\text{NH}^2) - \text{COOH}$ donnerait l'aspartate d'ammoniaque puis le succinate d'ammoniaque $\text{CO}^2\text{NH}^4 - \text{CH}^2 - \text{CH}^2 - \text{CO}^2\text{NH}^4$. Si cette hypothèse est exacte, on peut assez facilement la contrôler. Il suffira dans la molécule de l'acide aminé $\text{R} - \text{CH} - \text{COOH}$ de bloquer le



groupe acide par un alcali fort pour que les réactions avec les acides aminés deviennent négatives, on aura ainsi la preuve que c'est la fonction sel ammoniacal qui intervient et non la fonction amine.

Nous pourrions d'autant mieux le prouver que si nous employons les sels sodés des amino-acides en présence du glucose, du lévulose, de la glycérine ou de la mannite, on

devra avoir cette fois une réaction positive par suite de la formation d'un sel ammoniacal aux dépens des acides formés des sucres et non plus de l'acide provenant de l'acide aminé.

Cette expérience est assez délicate à réaliser. Nous avons voulu tout d'abord nous rendre compte si le bacille pyocyanique se développait en milieu fortement alcalin. C'est qu'en effet la neutralisation de la fonction acide d'un acide aminé donne un corps très alcalin.

Nous avons donc pris du succinate d'ammoniaque auquel nous avons ajouté une quantité d'ammoniaque telle que l'alcalinité correspondait à celle de l'alanine sodée par exemple.

Dans ces conditions voici les résultats obtenus :

SUR GÉLOSE MINÉRALISÉE

Milieu au succinate d'ammoniaque alcalinisé de telle sorte que l'alcalinité corresponde à celle des milieux contenant un acide monoaminé sodé (solution à 1/10).	X gouttes.	{ Bon développement. { Coloration verte.
--	------------	---

Ensuite nous avons procédé à la neutralisation exacte des acides aminés. Dans les premiers essais nous n'avions pas ajouté la quantité suffisante de soude pour bloquer le groupe COOH, par crainte d'une alcalinité trop excessive et nous avons obtenu des résultats positifs mais très retardés. Dans une seconde série d'expériences nous avons opéré très exactement avec une solution titrée normale de soude et la neutralisation théorique faite, nous avons ajouté 1/10 de cent. cube de soude normale en plus, pour être certain d'une neutralité complète.

Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

CULTURES EN PRÉSENCE D'ACIDES MONO-AMINÉS NEUTRALISÉS.

SUR GÉLOSE MINÉRALISÉE

Glycocolle sodé	exactement neutralisé				{ Pas de développement. Pas de coloration.
— + Glucose	—	—			{ Bon développement. Coloration verte nette.
— + Léulose	—	—			d°
— + Mannite	—	—			d°
— + Glycérine	—	—			d°

SUR GÉLOSE MINÉRALISÉE

Alanine sodée (exactement neutralisée)					{ Pas de développement. Pas de coloration.
— + Glucose — —					{ Bon développement. Coloration verte nette.
— + Lévéulose — —					d°
— + Glycérine — —					d°
— + Mannite — —					d°
Leucine sodée (exactement neutralisée)					{ Pas de développement. Pas de coloration.
— + Glucose — —					{ Bon développement. Colorat. verte intense.
— + Lévéulose — —					d°
— + Glycérine — —					d°
— + Mannite — —					d°
Asparagine sodée (exact. neutralisée).				{ V gouttes. X gouttes.	{ Pas de développement. Pas de coloration.
— + Glucose — —					{ Bon développement. Coloration verte.
— + Lévéulose — —					d°
— + Glycérine — —					d°
— + Mannite — —					d°
Acide aspartique. 1. sodé (exactement neutralisé)					{ Pas de développement. Pas de coloration.
— + Glucose — —					{ Bon développement. Coloration verte nette.
— + Lévéulose — —					d°
— + Glycérine — —					d°
— + Mannite — —					d°

Nous pouvons encore invoquer à l'appui de cette hypothèse que la fonction amine n'intervient que pour la formation d'un sel ammoniacal en rapportant l'expérience faite avec l'asparagine dont la fonction NH_2 est bloquée par l'acide chlorhydrique. Dans ces conditions le groupe azoté de l'amine ne peut plus être utilisé par le microbe et les résultats deviennent négatifs. C'est ce que confirment nos expériences faites en ajoutant des quantités croissantes de chlorhydrate d'asparagine pour éviter de donner au milieu une acidité trop forte.

CULTURES EN PRÉSENCE DE CHLORHYDRATE D'ASPARAGINE.

SUR GÉLOSE MINÉRALISÉE
Après 3 jours d'étuve

Chlorhydrate d'asparagine + V gouttes.					{ Pas de développement.
— — + X —					{ Pas de coloration.
— — + XV —					

Ce rôle de l'asparagine intervenant comme sel ammoniacal avait déjà été entrevu par Arnaud et Charrin (1) qui, les premiers, ont donné une explication de la transformation bactérienne de l'asparagine, par désamidation.

D'autre part, A. Blanchetière (2), étudiant le mécanisme de la dégradation de cette substance, en présence du bacille fluorescent, voisin du bacille pyocyanique, a montré qu'il y avait désamination et formation de sel ammoniacal.

Enfin Aubel (3) dans la dégradation de l'asparagine par le bacille pyocyanique a trouvé parmi les principaux termes de passage, entre l'amide et l'acide carbonique, les acides fumariques, maliques, succiniques, propioniques, maloniques, acétiques et formiques susceptibles de donner des sels ammoniacaux.

Les expériences sur les amines et les acides aminés nous conduisent à envisager *le rôle de l'albumine comme substance nutritive du microbe*.

Les matières albuminoïdes sont en effet formées d'acides aminés qui en se condensant les uns avec les autres créent des fonctions amides. Il en résulte que les matières albuminoïdes pures, c'est-à-dire sans traces d'éléments étrangers, devraient donner un résultat négatif.

Nous avons essayé de réaliser ces conditions.

A cet effet nous avons dialysé sur sacs de collodion non riciné, du sérum de cheval recueilli aseptiquement. Ces sacs mesuraient 12 cent. cubes de longueur et plongeaient dans de l'eau stérile. Montés sur tubes de verre ils étaient maintenus par un tampon de coton dans le goulot du flacon contenant l'eau, sans en toucher le fond, baignant ainsi dans le liquide sur les 2/3 environ de leur hauteur. Le sérum à dialyser ayant été introduit avec précaution dans le sac, on a laissé le tout en contact pendant vingt-quatre heures à l'expiration desquelles le sac a été remplacé, dans les mêmes condi-

(1) A. ARNAUD et A. CHARRIN, Recherches chimiques sur les sécrétions microbiennes. Transformation et élimination de la matière organique azotée par le bacille pyocyanique dans un milieu de culture déterminée. *C. R. Acad. Sc.*, **112**, p. 755, 1891.

(2) A. BLANCHETIÈRE, Action du bacille fluorescent liquéfiant de Flügge sur l'asparagine en milieu chimiquement défini (2^e mémoire), produits et mode d'attaque de l'asparagine. *Ann. Inst. Pasteur*, **34**, p. 392, 1920.

(3) E. AUBEL. *Loc. cit.*, p. 40-95.

tions, en présence d'une nouvelle quantité d'eau. L'opération a été renouvelée deux fois consécutives à vingt-quatre heures d'intervalle.

On a ainsi obtenu, d'une part, un dialysat et d'autre part un liquide albumineux non dialysé. Le premier a été évaporé à sec et repris par l'alcool à 95° chaud. Celui-ci a laissé une partie insoluble. La solution alcoolique a été évaporée à sec et le résidu repris par quelques centimètres cubes d'eau. Ce liquide est ajouté à des tubes de gélose minéralisée.

D'autre part, le contenu opalescent du sac, recueilli dans une fiole stérile, a été additionné de quelques gouttes de solution de chlorure de sodium à 20 p. 100, puis d'une même quantité de gouttes de solution de phosphate de soude à 10 p. 100 pour éclaircir le liquide. On a ensuite réparti en tubes stériles et coagulé au bain-marie en tubes couchés.

Avec une anse de platine chargée de colonies microbiennes provenant d'une culture luxuriante sur succinate d'ammoniaque on aensemencé :

- 2 tubes de gélose additionnée du dialysat;
- 2 tubes d'albumine du sérum coagulée et dialysée;
- 2 tubes d'albumine du sérum coagulée, additionnée de liquide de dialysat.

On a constaté après vingt-quatre heures d'étuve une coloration verte des premiers et après quarante-huit heures une coloration verte des troisièmes; quant aux tubes de la deuxième série, la coloration, puis la dissolution de l'albumine ne se sont manifestées qu'au bout de quatre ou cinq jours. Il est probable que, malgré la dialyse prolongée, il restait encore une trace de cette substance, de ce *primum movens*, qui a permis au microbe de se développer et d'attaquer alors l'albumine.

Nous avons essayé de pratiquer le même essai de dialyse sur la peptone espérant pouvoir séparer d'une part les substances dialysables capables de produire la pyocyanine et les substances non dialysables qui n'auraient donné aucun résultat. Nous n'avons obtenu qu'un résultat peu net. Certes le liquide dialysé donne bien une coloration plus rapide et plus intense, mais dans cette question l'appréciation étant très difficile il est préférable de n'en pas tenir compte.

La démonstration serait encore plus concluante si nous

avons pu nous procurer un polypeptide de synthèse assez condensé. Nous avons la conviction que très probablement ce polypeptide se fût montré inactif.

N. B. — Cependant dans un essai effectué en présence de *leucine-glycine* (substance plus voisine des acides aminés que des composés albuminoïdes), obligeamment mise à notre disposition par M. le Dr Guggenheim, on a constaté un bon développement du microbe et la production d'une coloration verte très nette.

CULTURES SUR MILIEUX LIQUIDES, NON MINÉRALISÉS, NE CONTENANT
QUE DES SELS AMMONIACAUX ORGANIQUES.

Le sel ammoniacal organique étant seul *nécessaire* à la production de la pyocyanine, sa présence doit être seule *suffisante* pour obtenir celle-ci en l'absence de toute autre substance alimentaire minérale et organique. C'est ce que nous avons essayé de réaliser; la réussite n'est pas toujours facile, elle est inconstante : parfois rapide, parfois lente, sans qu'il soit possible de l'expliquer. Peut-être le micro-organisme mis dans l'eau, contenant si peu de substance, se détruit-il en plus ou moins grande partie et qu'alors il faut un certain temps pour que la réaction apparaisse. En tout cas, il n'est pas douteux que dans l'eau additionnée de divers sels organiques ammoniacaux, il y a production de pyocyanine.

Ces cultures ont été tentées en l'absence de toute substance minérale et en présence des sels ammoniacaux des acides organiques mis en expérience sur les milieux solides. Dans ces conditions le développement est beaucoup plus lent et la manifestation de coloration, quand elle a lieu, se produit plus tardivement. La quantité d'ammoniaque offerte au microbe a été la même que dans les essais antérieurs, c'est-à-dire calculée de telle sorte que X gouttes de solution de ces sels correspondent à une teneur de 0 gr. 011 d'ammoniaque. L'eau employée a été l'eau rigoureusement neutre et redistillée dans un appareil de verre.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

I. — SELS AMMONIACAUX D'ACIDES MONOBASIQUES

A FONCTION SIMPLE.

a) *Acides gras saturés d'hydrogène.*

Formiate d'ammoniaque	X gouttes.	{ Pas de coloration
Eau	25 cent. cubes.	{ (après 6 jours d'étuve).
Acétate d'ammoniaque	X gouttes.	{ Légère coloration
Eau	25 cent. cubes.	{ (après 6 jours d'étuve).
Propionate d'ammoniaque	X gouttes.	{ Très légère coloration
Eau	25 cent. cubes.	{ (après 6 jours d'étuve).
Butyrate d'ammoniaque	X gouttes.	{ Coloration verte
Eau	25 cent. cubes.	{ (après 6 jours d'étuve).
Valérianate d'ammoniaque	X gouttes.	{ Coloration nette
Eau	25 cent. cubes.	{ (après 6 jours d'étuve).
Caproate d'ammoniaque	X gouttes.	{ Coloration nette
Eau	25 cent. cubes.	{ (après 6 jours d'étuve).
Isocaproate d'ammoniaque	X gouttes.	{ Pas de coloration
Eau	25 cent. cubes.	{ (après 6 jours d'étuve).

b) *Acides alcools monobasiques et monoalcoooliques.*

Lactate d'ammoniaque	X gouttes.	{ Coloration nette
Eau	25 cent. cubes.	{ (après 11 jours d'étuve).

c) *Acides alcools monobasiques et pentalcoooliques.*

Gluconate d'ammoniaque	X gouttes.	{ Coloration nette
Eau	25 cent. cubes.	{ (après 2 jours d'étuve).

II. — SELS AMMONIACAUX D'ACIDES BIBASIQUES.

a) *Acides bibasiques de la série succinique.*

Oxalate d'ammoniaque	X gouttes.	{ Pas de coloration
Eau	25 cent. cubes.	{ (après 26 jours d'étuve).
Malonate d'ammoniaque	X gouttes.	{ Légère coloration
Eau	25 cent. cubes.	{ (après 26 jours d'étuve).
Méthylmalonate d'ammoniaque	X gouttes.	{ Pas de coloration
Eau	25 cent. cubes.	{ (après 26 jours d'étuve).
Succinate d'ammoniaque	X gouttes.	{ Coloration verte
Eau	25 cent. cubes.	{ (après 3 jours d'étuve).
Glutarate d'ammoniaque	X gouttes.	{ Coloration
Eau	25 cent. cubes.	{ (après 14 jours d'étuve).
Subérate d'ammoniaque	X gouttes.	{ Pas de coloration
Eau	25 cent. cubes.	{ (après 26 jours d'étuve).
Sébacate d'ammoniaque	X gouttes.	{ Pas de coloration
Eau	25 cent. cubes.	{ (après 26 jours d'étuve).

b) *Acides alcools bibasiques et dialcoooliques.*

Tartrate d'ammoniaque	X gouttes.	{ Pas de coloration
Eau	25 cent. cubes.	{ (après 11 jours d'étuve).

c) *Acides alcools bibasiques et tétralcooliques.*

Mucate d'ammoniaque.	X gouttes.	} Pas de coloration (après 11 jours d'étuve).
Eau.	25 cent. cubes.	

III. — SELS AMMONIACAUX D'ACIDES TRIBASIQUES.

a) *Acides alcools tribasiques et monoalcooliques.*

Citraté d'ammoniaque.	X gouttes.	} Coloration (après 48 heures d'étuve).
Eau.	25 cent. cubes.	

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les résultats qui se dégagent de ces recherches sont les suivants :

I. La présence d'un sel ammoniacal est nécessaire à la formation du pigment pyocyanique. La nature de l'acide salifié par l'ammoniaque n'est pas indifférente.

II. La formation du pigment dans un milieu non additionné de sel ammoniacal peut avoir lieu si les modifications apportées par la culture même au milieu nutritif se traduisent par la formation de sel ammoniacal.

III. La présence d'un sel ammoniacal n'est pas seulement nécessaire à la formation du pigment, elle est, du moins pour certains acides, *suffisante*.

On peut exposer de la façon suivante les faits particuliers qui appuient les conclusions précédentes :

A. — 1° Les sels d'acides gras monobasiques suivants acétique, propionique, butyrique, valérianique, caproïque) ont été favorables au développement du microbe et à la production de pyocyanine.

2° L'acide formique s'est toujours montré un aliment défavorable à tous points de vue.

3° L'acide isocaproïque, contrairement à son isomère l'acide caproïque, ne donne pas lieu à la formation de pyocyanine, ce qui peut permettre de différencier un mélange de ces deux acides renfermant une petite quantité d'acide caproïque.

4° Les sels d'acides gras monobasiques à fonction éthylénique se sont montrés inactifs, à l'exception toutefois de l'acide sorbique qui est un aliment favorable.

5° Les sels d'acides aromatiques monobasiques se sont montrés de mauvais aliments.

B. — 1° Les sels des acides bibasiques, de la série succinique, sont tous actifs, sauf le premier terme : l'acide oxalique.

2° Parmi les sels des acides bibasiques à double liaison éthy-

lénique, seuls les sels des acides en position *trans* favorisent la production du pigment, tandis que ceux des acides en position *cis* ne le donnent pas sur un milieu gélosé minéralisé.

3° Les sels des acides aromatiques bibasiques ne peuvent pas servir d'aliment.

C. — 1° Parmi les sels des acides à fonctions complexes, les sels des acides monobasiques à fonction alcool sont de bons aliments et de bons producteurs de pyocyanine, ainsi que l'acide pyruvique (acide cétonique).

2° Les acides phénoliques ont donné un résultat négatif.

3° Les sels des acides bibasiques, à fonction alcool ne semblent agir que lorsqu'il reste des atomes de carbone ne supportant pas de groupement oxhydrile.

Si cette substitution existe sur tous les atomes de carbone, il ne se manifeste ni développement de colonies, ni production de pigment.

4° L'isomérisie optique ne semble pas jouer un rôle comparable à celui que nous avons observé pour les acides gras bibasiques à fonction éthylénique stéréo-isomères.

D. — 1° Les amines, à l'état de chlorhydrates, ne peuvent pas servir à la nutrition du bacille pyocyanique, même en présence d'hydrates de carbone, et par conséquent sont impropres à la production de la pyocyanine.

2° Les amides seules ou en présence d'hydrates de carbone ne peuvent pas servir à la nutrition du bacille pyocyanique, il n'y a d'exception que pour l'urée, mais parce que celle-ci se transforme en carbonate d'ammoniaque qui, se combinant aux acides organiques provenant de la destruction des sucres, conduit à la production d'un sel ammoniacal, ce qui ramène alors au cas précédent.

3° Les acides aminés sont de moins bons aliments que les sels ammoniacaux. Le glycocolle, premier terme de la série, n'agit pas seul mais, en présence d'hydrates de carbone, il favorise la production du pigment.

4° Parmi les acides aminés, la tyrosine s'est montrée défavorable.

Dans cette action sur les acides aminés, le microbe donne

par désamination, d'abord de l'ammoniaque qui se transporte sur la fonction acide en donnant le sel ammoniacal utile. Si la fonction acide est bloquée, la réaction ne se fait plus, mais elle peut se produire si on y ajoute un sucre ou des alcools polyatomiques donnant des acides par décomposition de la molécule; dans ces conditions, l'ammoniaque se porte sur l'acide ainsi formé et l'acide aminé ne sert plus qu'à la formation d'un sel ammoniacal.

E. — Les sels ammoniacaux minéraux, employés seuls, ne peuvent pas servir à la nutrition du micro-organisme. Il en est de même pour les hydrates de carbone (monoses, trioses, polyoses et alcools polyatomiques) et il n'y a pas production de pigment.

Le mélange des hydrates de carbone et des alcools polyatomiques avec les sels ammoniacaux minéraux ne peut servir que pour deux alcools polyatomiques : la glycérine et la mannite, et pour deux hexoses : le glucose et le lévulose, et seulement en présence de nitrate et de carbonate. C'est la présence simultanée de corps qui peuvent s'oxyder pour donner des acides et des sels susceptibles de fournir de l'ammoniaque ou du carbonate d'ammoniaque qui permet la production de pyocyanine par formation d'un sel organique ammoniacal.

Les bioses et les polyoses pouvant donner par dédoublement du glucose ou du lévulose ne sont pas attaqués.

F. — L'albumine semble être un mauvais aliment pour le microbe qui peut-être ne se développerait pas sur ce milieu, si cette substance ne contenait pas un ou plusieurs acides aminés, un ou plusieurs sels ammoniacaux, en un mot « *un primum movens* » capable d'assurer le développement initial du microbe qui peut alors attaquer l'albumine pour engendrer les substances nécessaires à sa nutrition.

Vu, bon à imprimer :
Le Président de la Thèse,
RADAIS.

Vu :
Le Doyen de la Faculté,
• RADAIS.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
P. APPELL.

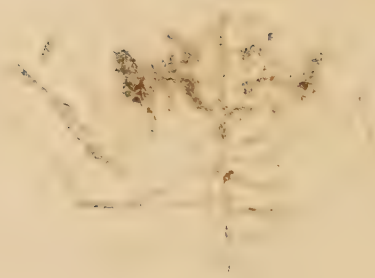


TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	5
------------------------	---

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE I. — Conditions de culture. — Origine du microbe.	
— Milieux cultureux	9
Préparation du milieu solide	10
Composition des cendres de la gélose	12
Réaction des milieux minéralisés :	
A. Milieux non additionnés de succinate d'ammoniaque.	15
B. Milieux additionnés de succinate d'ammoniaque . .	15
Influence de la réaction sur les milieux envisagés	15
Méthode d'ensemencement	16
CHAPITRE II. — Production et extraction de la pyocyanine. . .	18
Caractérisation de la pyocyanine.	19

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE I. — Cultures en présence des sels ammoniacaux d'acides organiques monobasiques	21
I. Acides gras monobasiques	22
II. Acides monobasiques de la série grasse possédant une fonction éthylénique (acides oléiques)	23
III. Acides propioliques	23
IV. Acides aromatiques monobasiques	23
Essai de différenciation des acides caproïque et isocaproïque.	25
CHAPITRE II. — Cultures en présence des sels ammoniacaux d'acides organiques bibasiques.	27
I. Acides bibasiques de la série grasse (saturés d'hydrogène)	28
II. Acides bibasiques de la série grasse possédant une fonction éthylénique	28

CHAPITRE III. — Cultures en présence des sels ammoniacaux d'acides organiques possédant une ou plusieurs fonctions oxygénées (alcool-phénol-cétone)	30
I. Acides alcools monobasiques	31
II. — acétones monobasiques	31
III. — phénols monobasiques	31
IV. — alcools bibasiques	31
V. — — tribasiques et monoalcooliques	32

TROISIÈME PARTIE

CHAPITRE I. — Cultures en présence d'amines	35
CHAPITRE II. — Cultures en présence d'amides	36
Cultures en présence d'amides additionnées de sucres ou d'alcools polyatomiques	40
CHAPITRE III. — Cultures en présence d'acides aminés	42

QUATRIÈME PARTIE

CHAPITRE I. — Cultures en présence de sels ammoniacaux minéraux	46
CHAPITRE II. — Cultures en présence d'alcools polyatomiques ou de sucres	47
CHAPITRE III. — Cultures en présence de sels ammoniacaux minéraux et de substances organiques ternaires (alcools ou sucres)	49

CINQUIÈME PARTIE

Exposé critique des résultats obtenus	55
Cultures en présence d'hydrates de carbone et d'ammoniaque pure	57
Cultures en présence d'urée et d'hydrates de carbone	58
Cultures en présence d'acides mono-aminés neutralisés	60
Cultures en présence de chlorhydrate d'asparagine	61
Cultures sur milieux liquides, non minéralisés, ne contenant que des sels ammoniacaux organiques	64
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	67

